

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平7-503622

第1部門第1区分

(43) 公表日 平成7年(1995)4月20日

(51) Int.Cl. <sup>9</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I
C 1 2 P 21/08		9161-4B	
C 0 7 K 16/00		8318-4H	
16/18		8318-4H	
16/32		8318-4H	
		9050-4B	
		C 1 2 N 15/ 00	Z N A A
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求(全 17 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願平6-514437  
 (86) (22) 出願日 平成5年(1993)12月10日  
 (85) 翻訳文提出日 平成6年(1994)8月11日  
 (86) 国際出願番号 PCT/US93/12039  
 (87) 国際公開番号 WO94/13806  
 (87) 国際公開日 平成6年(1994)6月23日  
 (31) 優先権主張番号 990, 263  
 (32) 優先日 1992年12月11日  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M C, NL, PT, SE), AU, CA, JP

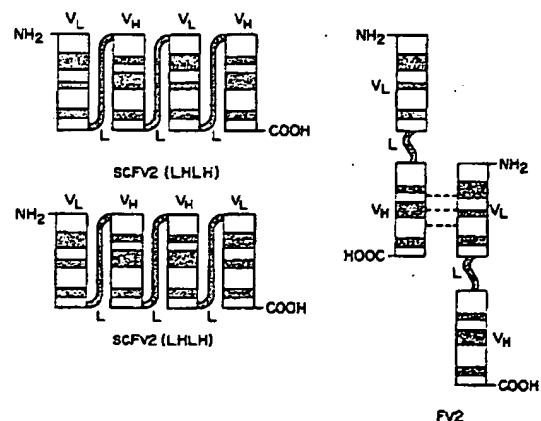
(71) 出願人 ザ ダウ ケミカル カンパニー  
 アメリカ合衆国, ミシガン 48640, ミッドランド, アボット ロード, ダウ センター 2030  
 (72) 発明者 メセス, ビーター エス.  
 アメリカ合衆国, コネチカット 06371, オールドライム, シル レーン 25  
 (72) 発明者 ゴーリー, ブライアン ビー.  
 アメリカ合衆国, ミシガン 48640, ミッドランド, オーチャード ドライブ 3713  
 (74) 代理人 弁理士 石田 敬 (外3名)

(54) 【発明の名称】 多価の一本鎖抗体

(57) 【要約】

本発明は、2以上の生物学的に活性な抗原結合部位を有する多価の一本鎖抗体を開示する。この多価の一本鎖抗体は、2本以上の一本鎖抗体を共有結合させるペプチドリンカーを用いることによって作った。各一本鎖抗体は、ペプチドリンカーにより、可変重鎖ドメインに連結されている可変軽鎖ドメインを有する。

共有及び非共有結合型一本鎖Fv多量体の図解



特許(内容に変更なし)

# 請求の範囲

1. 2以上的一本鎖抗体フラグメントを含んで成り、各フラグメントが抗原に対する親和性を有しており、ここでそのフラグメントは第一のペプチドリンカーにより共有結合されており、そして各フラグメントは:

- (a) 軽鎖可変ドメインを含んで成る第一ポリペプチド;
- (b) 重鎖可変ドメインを含んで成る第二ポリペプチド; 及び
- (c) この第一と第二のポリペプチドを機能的な結合性成分へと連結せしめる第二のペプチドリンカー;

を含んで成る、多価の一本鎖抗体。

2. この第一のペプチドリンカーが下記のアミノ酸配列

Leu Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys Asp Ala Ala Lys Lys Asp Ala Lys Asp Ala Lys Lys  
Asp Leu

を有する、請求項1記載の多価の一本鎖抗体。

3. この軽鎖可変領域が、図3に示すものと実質的に同じアミノ酸配列を有しており、そしてこの重鎖可変領域が、図5に示すものと実質的に同じアミノ酸配列を有している、請求項1記載の多価の一本鎖抗体。

4. この第一と第二のペプチドリンカーが実質的に同じアミノ酸配列を有する、請求項1記載の多価の一本鎖抗体。

5. 多価の一本鎖抗体をコードする DNA配列であって、この多価の一本鎖抗体が2以上的一本鎖抗体フラグメントを含んで成り、各フラグメントが抗原に対する親和性を有しており、ここでそれらのフラグメントは第一のペプチドリンカーにより共有結合されており、そして各フラグメントは:

- (a) 軽鎖可変ドメインを含んで成る第一ポリペプチド;

特許(内容に変更なし)

## 明細書

### 多価の一本鎖抗体

本発明は一本鎖の多価抗体に関する。

抗体は、身体が外来物であると判断する特定の抗原又は物質に反応して免疫系により誘発されるイムノグロブリンの群に属するタンパク質である。5クラスのヒト抗体があり、各クラスは同一の基本構造を有している。抗体の基本構造は四量体、又はその複合体であり、軽鎖と重鎖とよりそれぞれが構成される二つの同一のヘテロダイマーより成る。軽鎖は一本の可変(V)ドメインと一本の定常(C)ドメインとより成り、他方、重鎖は一本の可変性ドメインと、3本以上の定常ドメインとより成る。軽鎖及び重鎖の両者に由来する、それぞれV<sub>L</sub>及びV<sub>H</sub>と称される可変ドメインは、イムノグロブリンの特異性を決定し、他方、定常(C)ドメインは様々なエフェクター機能をもたらす。

アミノ酸配列データは、それぞれの可変ドメインが、4つの比較的保存されたフレームワーク領域(FR)によりフラックされている3つの相補性決定領域(CDR)を含んで成ることを示唆する。このFRは可変領域ドメインの構造保全性を維持するものと考えられている。このCDRは個々の抗体の結合特異性にとって重要であり、且つ抗体の結合の多様性の原因であると推定されている。

抗体の基本構造は2本のヘテロダイマーを含むため、抗体は多価分子である。例えば、IgGクラスは2つの同一の抗原結合部位を有しており、他方、五量体IgMクラスは10の同一の結合部位を有している。

同一の遺伝系列及び結合特異性を有するモノクローナル抗体は診

- (b) 重鎖可変ドメインを含んで成る第二ポリペプチド; 及び
- (c) この第一と第二のポリペプチドを機能的な結合性成分へと連結せしめる第二のペプチドリンカー;

を含んで成る、DNA配列。

6. この第一のポリペプチドをコードする配列が図2のそれと実質的に同じであり、そして第二のポリペプチドをコードする配列が図3のそれと実質的に同じである、請求項5記載のDNA配列。

断及び治療剤の両方として有用とされている。モノクローナル抗体は、確立された手順に従い、マウスのリンパ球と適当なマウスミエロマ細胞系との融合により作られたハイブリドーマにより日常的に産出される。しかしながら、ヒトにおけるインビボ治療及び診断に於けるネズミ抗体の投与は、ヒト免疫系により誘発されるヒト抗マウス抗体応答に基づき制約されている。

キメラ抗体であって、一の種に由来する抗体の結合又は可変領域が別の種に由来する抗体の定常領域と組合せられたものが組換えDNA方法論により作られている。例えば、Sahagenら、J. Immunol., 137: 1066-1074 (1986); Sunら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 214-218 (1987); Nishimuraら、Cancer Res., 47: 899-1005 (1987); 及び Lieら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 3439-3443 (1987)を参照のこと。これらは腫瘍関連抗原に対するキメラ抗体を開示している。典型的には、ネズミ抗体の可変領域はヒト抗体の定常領域に連結されている。かかるキメラ抗体はその組成において大部分がヒトであるため、それらはネズミ抗体よりも免疫原性が実質的に低いものと予測される。

キメラ抗体は、抗原結合にとって必須でないが、その薬理動力学に影響を及ぼすタンパク質構造全体のうちの主要部分を構成するFc領域を保有し続けている。免疫療法又は免疫診断における抗体の利用のため、標的組織に迅速に集中し、且つ結合する抗体分子を得ること、及び未結合の物質が身体から迅速に排除されることが所望される。一般に、小さめの抗体フラグメントは高めの毛管浸透性を有しており、そして完全抗体よりも身体からより早く排除される。

抗原と相互作用するのは軽鎖及び重鎖の可変領域であるため、一本のV<sub>L</sub>と一本のV<sub>H</sub>とにより一本鎖抗体フラグメント(scFvs)が作られており、これは8つのCDRを含み、それらはペプチドリンカ

一(米国特許第 4,946,778号)により連結された $V_L-L-V_L$ 。ポリペプチドを成しており、ここではペプチドリンカーを表している。 $V_L$ と $V_H$ ドメインが配向 $V_L-L-V_L$ であるscFvが米国特許第 5,132,405号に開示されている。

完全抗体にとっての最少限の2つの結合部位と比べてscFvは一つのそれを有するため、scFvは2以上の結合部位を含む抗体に比べて低い活性を有している。

従って、このポリペプチドの活性を高めるため、且つその抗原認識特性を維持又は高めるため、複数の結合部位を有するscFvの構築体を得ることが有利であろう。加えて、標的組織上の別々のエピトープの認識を可能とする、別の免疫エフェクター機能の抗体ベース増強を可能とする、又は治療もしくは診断成分の抗体増強を可能とする二価特異的である多価scFvを得ることが有利であろう。

それぞれ第一ペプチドリンカーにより共有結合している一本の $V_L$ と一本の $V_H$ ドメインとを有する一本鎖抗体フラグメントは、第二ペプチドリンカーによって共有結合されて、完全抗体の結合親和力を維持している多価一本鎖抗体を形成できることが発見された。一態様において、本発明は抗原に対する親和性を有する多価一本鎖抗体であり、ここでこの多価一本鎖抗体は2本以上の軽鎖可変ドメインと2本以上の重鎖可変ドメインとを含んで成り、ここで各可変ドメインは少なくとももう一つの別の可変ドメインに連結されている。

別の態様において、本発明は2本以上の一本鎖抗体フラグメントを含んで成る多価一本鎖抗体であり、各フラグメントは抗原に対する親和性を有しており、ここでこれらのフラグメントは第一ペプチドリンカーにより共有結合しており、そして各フラグメントは：

(a) 軽鎖可変ドメインを含んで成る第一ポリペプチド；

図5は CC49V<sub>H</sub> のアミノ酸配列を示す。

図6は p49LHLHにおけるCC49一本鎖抗体LHLHのヌクレオチド配列及びアミノ酸配列を示す。

図7は p49LHHLにおけるCC49一本鎖抗体LHHLのヌクレオチド配列及びアミノ酸配列を示す。

図8はプラスミド pSL301T及びpSL301HTの構造を示す。

図9はプラスミド p49LHHLの構造を示す。

図10はプラスミド p49LHLHの構造を示す。

図11はCC49IgG、CC49scFv2及びCC49scFvを用いた、融合因子としてピオチニル化 CC49IgGを用いる融合アッセイの結果を示す。

本明細書で挙げた全ての文献の教示全体を引用することで本明細書に組入れる。

接頭、アミノ酸、ペプチド、保護基、活性基等を略すとき、それらはIUPAC IUB (Commission on Biological Nomenclature) 又は関連分野の實際に従って略している。

本明細書で用いる「一本鎖抗体フラグメント」(scFv)又は「抗体フラグメント」なる語は、 $V_L-L-V_L$ により表わされる、ペプチドリンカー(L)により $V_H$ ドメインに連結された $V_L$ ドメインを含むポリペプチドを意味する。 $V_L$ と $V_H$ ドメインとの順序は逆であってよく、 $V_H-L-V_L$ として表わされるポリペプチドが獲得できる。「ドメイン」は、独立の機能、例えば抗原結合又は抗原認識を及ぼすタンパク質のセグメントである。

「多価一本鎖抗体」はペプチドリンカーにより共有結合した2以上の一本鎖抗体フラグメントを意味する。この抗体フラグメントは連結されて、

$V_L-L-V_L-L-V_L-L-V_L$ ； $V_L-L-V_L-L-V_L-L-V_L$ ； $V_H-L-V_L-L-V_L-L-V_L$ ；

又は

(b) 重鎖可変ドメインを含んで成る第二ポリペプチド；及び

(c) この第一と第二のポリペプチドを機能的な結合性成分へと連結せしめる第二ペプチドリンカー；

を含んで成る。

別の態様において、本発明は、多価一本鎖抗体をコードする DNA 配列を提供し、ここでこの多価の一本鎖抗体は2本以上の一本鎖抗体フラグメントを含んで成り、各フラグメントは抗原に対する親和性を有しており、ここでこれらのフラグメントは第一ペプチドリンカーにより共有結合しており、そして各フラグメントは：

(a) 軽鎖可変ドメインを含んで成る第一ポリペプチド；

(b) 重鎖可変ドメインを含んで成る第二ポリペプチド；及び

(c) この第一と第二のポリペプチドを機能的な結合性成分へと連結せしめる第二ペプチドリンカー；

を含んで成る。

この多価一本鎖抗体は、完全抗体の特異性及び活性を有するが、サイズにおいてもっと小さく、より迅速な毛管通過を可能とする抗体フラグメントの構築を可能とする。多価一本鎖抗体は、結合部位が2種類の抗原決定基でありうる多価一本鎖抗体の構築も可能とするであろう。

#### 図面の簡単な説明

図1は、 $V_L-L-V_L-L-V_L-L-V_L$  (LHLH) と $V_L-L-V_L-L-V_L-L-V_L$  (LHHL) の形態を有する共有結合型一本鎖抗体及び非共有結合型Pv一本鎖抗体(Pv2)を示す。

図2は CC49V<sub>H</sub> のヌクレオチド配列を示す。

図3は CC49V<sub>H</sub> のアミノ酸配列を示す。

図4は CC49V<sub>H</sub> のヌクレオチド配列を示す。

$V_H-L-V_L-L-V_L-L-V_L$

の $V_L$ と $V_H$ ドメインの順序を有する二価の一本鎖抗体を形成してよい。

三価以上の一本鎖の多価抗体は、追加のペプチドリンカーによって二価の一本鎖抗体に連結された1又は数本の抗体フラグメントを有する。好適な態様においては、 $V_L$ と $V_H$ ドメインの数は等しい。

本発明は、

$V_H-L-V_H-L-V_L-L-V_L$ 又は $V_L-L-V_L-L-V_H-L-V_H$

で表示されうる多価の一本鎖抗体も提供する。

$V_L-L-V_L-L-V_L-L-V_L$  (LHLH) 及び $V_L-L-V_L-L-V_L-L-V_L$  (LHHL) の形態を有する共有結合型一本鎖抗体を図1に示す。非共有結合型Pv一本鎖抗体(Pv2)も図1に示している。

本発明において利用するための一本鎖抗体フラグメントは任意の抗体の軽鎖及び/又は重鎖可変ドメインに由来しうる。好ましくは、その軽鎖と重鎖可変ドメインは同一の抗原に特異的である。連結されて多価の一本鎖抗体を構成している個々の抗体フラグメントは、同一の抗原に対して特異的でありうるか、又は別々の抗原に対して特異的でありうる。

一本鎖の多価抗体についての DNA 配列を含むベクターを作るため、これらの領域をエンコードする遺伝子の起源が必要とされる。適当な DNA 配列は公共の起源から入手するか、又は当業界に公知の標準の手順によって獲得できる。例えば、The U.S. Department of Health and Human Services により公開された KabatらのSequences of Proteins of Immunological Interest 第4版(1991)は、今日まで述べられているほとんどの抗体可変領域の配列を開示している。

遺伝子配列が未知のとき、ベクターの中にクローンする DNA の起

源として、逆転写酵素仲介合成によりmRNAから獲得したcDNA配列を利用することが一般に可能である。抗体に関して、mRNAの起源は広範囲にわたるハイブリドーマから獲得できる。例えば、カタログATCC Cell Lines and Hybridomas, American Type Culture Collection, 20309 Parklawn Drive, Rockville Md., USA (1990)を参照のこと。その中に挙げられている幅広い様々な抗原と反応性のモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマがそのCollectionより入手でき、そして本発明において利用できる。これらの細胞系及びその他の類似の種類が、可変ドメインをコードするmRNAの起源として、又はモノクローナル抗体自体のアミノ酸配列を決定するために抗体タンパク質を獲得するように利用できよう。

抗体の可変領域は、適当な脊椎動物、通常は家畜動物とそして最も好都合にはマウスを免疫することにより得られもする。その免疫原は腫瘍の抗原であるか、又はハプテンであるとき、キーホールリンベットヘモシアニン(KLE)の如きの抗原に対するこのハプテンの抗原性複合体であろう。免疫化は宿主哺乳動物への通常は2〜3週間置きの免疫原の1又は数回の繰り返し注射によって好適に実施される。通常、最後の免疫の3日後、脾臓を取り出し、そしてmRNAが当業界に公知の標準手順により簡単に獲得できるようにハイブリドーマを供するための細胞融合に利用する単独細胞へと解離する。腫瘍の抗体が獲得でき、そしてそのアミノ酸配列だけを知り得たら、その配列を逆転写することが可能である。

本発明において有用なV<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>ドメインは好ましくは、1990年3月3日に公開されたPCT出願WO 90/04410及び1988年1月26日に公開されたPCT出願WO 89/00692に開示されている、腫瘍関連糖タンパク質72抗原に対する一連のCC抗体の一つから獲得できる。より好ましいのは、PCT公開WO 90/04410及びWO 89/00692に

する。

そのリンカーペプチドは抗体フラグメントに対して、その個々の抗体フラグメントへのこのリンカーの結合がその抗原認識部位の結合能力を妨害しないように付加されていることも必要である。

好適なリンカーは、PantolianoらのBiochem., 30, 10117-10125 (1991)に開示されている205Cと称されているヘリカルリンカーを基礎とするが、その最初と最後のアミノ酸は、一端にあるXhoI部位と、他端にあるHindIII部位により指定されるコドンで理由に改えられている。

好適なリンカーのアミノ酸配列(SEQ ID NO: 5)は下記の通りである：

Leu-Ser-Ala-Asp-Asp-Ala-Lys-Lys-Asp-Ala-Ala-Lys-Lys-Asp-Asp-Ala-Lys-Lys-Asp-Asp-Ala-Lys-Lys-Asp-Leu。

このリンカーは一般に10〜50のアミノ酸残基である。好ましくは、このリンカーは10〜30のアミノ酸残基である。より好ましくは、このリンカーは12〜30のアミノ酸残基である。最も好ましくは、このリンカーは15〜25のアミノ酸残基である。

本発明の分子の製造のための発現媒体にはプラスミド又はその他のベクターが含まれる。一般に、かかるベクターは宿主細胞と適合性な種に由来するレプリコンとコントロール配列とを含む。このベクターは通常レプリコン部位、及び形質転換細胞の中での表現型選別を供することのできる特定の遺伝子を保有している。例えば、大腸菌(E. coli)はpBR322を用いて容易に形質転換される(Bolivarら、Gene, 2, 95-(1977)又はSambrookら、Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Press, New York, 第2版(1989))。

真核細胞にとって適当なプラスミドも利用できる。S. セレビジェ(S. cerevisiae)又は一般のパン酵母が真核微生物の中で最も

においてCC48と表示されているモノクローナル抗体に由来するV<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>ドメインである。CC48のV<sub>H</sub>をコードするヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 1)は図1に示すものと実質的に同じである。CC48のV<sub>L</sub>のアミノ酸配列(SEQ ID NO: 2)は図2に示すものと実質的に同じである。CC49のV<sub>H</sub>をコードするヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 3)は図3に示すものと実質的に同じである。CC49のV<sub>L</sub>をコードするアミノ酸配列(SEQ ID NO: 4)は図4に示すものと実質的に同じである。

本発明の抗体フラグメント及び多価の一本鎖抗体を形成するため、適当なペプチドリンカーを得ることが必要である。V<sub>H</sub>とV<sub>L</sub>ドメインを連結するための適当なリンカーは、V<sub>H</sub>とV<sub>L</sub>ドメインが、一本鎖ポリペプチドであって完全抗体のものと構造に非常に類似する三次元構造を有し、従ってその抗体フラグメントが由来している完全抗体の結合特異性を保持しているポリペプチド鎖へと折りたたまれることを可能にするものである。scFvを連結するための適当なリンカーは、各イムノグロブリンフラグメントのV<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>ドメインが三次元構造であって、その各フラグメントが、そのイムノグロブリンフラグメントが由来している完全抗体の結合特異性を保持するような三次元構造を有するように、2以上のscFvを連結することの可能なものである。所望の特性を有するリンカーは、その開示内容を引用することで本明細書に記入する米国特許第4,946,778号に開示の方法により獲得できる。この第4,946,778号に記載の方法により作られたポリペプチド配列より、ポリペプチドをコードする遺伝子配列が獲得できる。

好ましくは、V<sub>H</sub>とV<sub>L</sub>ドメインを連結してscFvを形成せしめるペプチドリンカーと、2以上のscFvを連結して多価の一本鎖抗体を形成せしめるペプチドリンカーとは実質的に同じアミノ酸配列を有

一般的に利用されているが、数多くのその他の株、例えばピシアバストリス(Pichia pastoris)が有用である。多細胞生物、例えばATCCより入手できるSP2/O又はチャイニーズハムスター卵巣に由来する細胞の培養物も宿主として利用できる。哺乳動物細胞にとって適当な典型的なベクタープラスミドはpSV2neo及びpSV2gpt(ATCC)；pSVL及びpKSV-10(Pharmacia)；pBPV-1/pML2d(International Biotechnology, Inc.)である。

本発明のポリペプチドについての遺伝子を発現するための原核及び真核ウィルス発現ベクターの利用も考慮される。

この発現ベクター及びこの一本鎖の多価抗体をコードするインサートは、その挿入連結部において適合性制限部位を有し、且つその制限部位が挿入の領域にとって固有であることが好ましい。ベクター及びインサートの両者とも制限エンドヌクレアーゼにより処理し、次いで任意の様々な方法、例えばSambrookら、前掲に記載の方法によりリゲートする。

本発明の一本鎖の多価抗体の製造にとって好適なベクターの遺伝子構築物は、構成的に活性な転写プロモーター、新生一本鎖ポリペプチドの合成/細胞の外への分泌を誘導するシグナルペプチドをエンコードする領域を含むものである。好ましくは、その発現速度は、不溶性物質としてそのポリペプチドが蓄積することを避けるために輸送、折りたたみ及び集成過程とつり合う。レプリコン及びコントロール配列に加えて、一本鎖ポリペプチドの最適な合成にとって追加の要素が必要とされる。これらの要素にはスプライスシグナル、並びに転写プロモーター、エンハンサー、及び終止シグナルが含まれる。更に、追加の遺伝子及びその生成物が集成及び折りたたみを助長するために必要とされる(シャペロン)。

市販されているベクターはベクターにとって上記の基準を満たす

ように簡単に改変されうる。かかる改変は入手できる書物及び本明細書における教示により、当業者によって容易に実施される。

更に、このクローニングベクターは選択マーカー、例えば薬剤耐性マーカー、又は宿主細胞による選別できる特徴の発現を引き起こすその他のマーカーを含むことが好ましい。「宿主細胞」とは、組換え DNA 技術を用いて構築されたベクターにより超換的に形質転換されうる細胞である。薬剤耐性又はその他の選択マーカーは形質転換の選別をある程度助長することを意図する。更に、選択マーカー、例えば薬剤耐性マーカーの存在は、夾雑微生物が培養地の中で繁殖することを防ぐうえで利用されうる。この態様において、かかる特定の形質転換細胞の培養物は生存のために開発された表現型を必要とする条件のもとで細胞を培養することにより得られるであろう。

本発明の回収及び精製は当業界に公知の標準技術を利用して達成されうる。例えば、もしそれらが培養地の中に分泌されるなら、この一本鎖の多価抗体は限外濾過により濃縮されうる。そのポリペプチドが宿主細胞のペリプラズマ空間へと輸送されるなら、精製はその細胞に浸透圧ショックを与え、次いで限外濾過、抗原アフィニティークロマトグラフィー又はイオン交換クロマトグラフィーを用いるカラムクロマトグラフィー及びゲル濾過を実行することにより達成されうる。不溶性であり、屈折体 (refractile bodies)、通体封入体として存在しているポリペプチドは、細胞の溶解、封入体を単離するための遠心と洗浄の繰り返し、例えばグアニジン-HCl による可溶化、及び再度の折りたたみ、それに続く生物活性分子の精製によって精製できうる。

一本鎖の多価抗体の活性は当業界に公知の標準アッセイ、例えば競合アッセイ、酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) 及びラジオイムノアッセイ (RIA) により測定できうる。

IEF	等電点電気泳動
Kbp	キロ塩基対
LB	Luria-Bertani 培地
Mab	モノクローナル抗体
MES	2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸
MW	分子量
NBT	ニトロブルーテトラゾリウムクロリド
オリゴ	オリゴヌクレオチド
PAG	ポリアクリルアミドゲル
PAGE	ポリアクリルアミドゲル電気泳動
PBS	リン酸緩衝食塩水
PCR	ポリメラーゼ連鎖反応
pSCFV	SCFV をコードする DNA 配列を含むプラスミド
RIGS	ラジオイムノガイド外科
RIT	ラジオイムノ治療
scFv	一本鎖 Fv イムノグロブリンフラグメントモノマー
scFvs	共有結合した一本鎖 Fv イムノグロブリンフラグメントダイマー
SDS	ドデシル硫酸ナトリウム
TBS	トリス緩衝食塩水
トリス	(トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン)
TTBS	ツイーン 20 洗浄液
V <sub>H</sub>	イムノグロブリン重鎖可変ドメイン
V <sub>L</sub>	イムノグロブリン軽鎖可変ドメイン

#### 抗体

CC49: ヒト腫瘍関連糖タンパク質 72 (TAG-72) に特異的なネズミモノクローナル抗体; ATCC No. HB9459 として寄託。

本発明の多価の一本鎖抗体に診断及び治療における利用に固有の利点を供する。この多価の一本鎖抗体の利用は、大きめのフラグメント又は抗体分子全体の利用に勝る数多くの利点を供する。それらはその標的組織により迅速に到達し、そして身体からより迅速に排除される。

診断及び/又は治療用途のため、この多価の一本鎖抗体は 1 又は複数の抗体フラグメントが標的組織に対して特異的であるように、及び/又は複数の抗体フラグメントが診断もしくは治療因子に対して特異的であるように構築されうる。

本発明は更に、癌の如きの障害の診断及び/又は治療において有用な特に好都合な薬理組成物も考慮しており、ここでこの標的抗原はしばしば細胞の表層上で発現される。診断及び/又は治療用途のため、この多価の一本鎖抗体は適当なイメージ又は治療剤に当業界に公知の方法によって結合されうる。本発明の薬理組成物は当業界に公知の方法、例えば常用の混合、溶解又は凍結乾燥工程によって調製される。

本発明を、その単なる例示を意図する下記の実施例の考慮により更に明らかにする。

#### 略語

BCIP	5-ブromo-4-クロロ-3-インドイルホスフェート
bp	塩基対
Bis-Tris	ブロバン (1,3-ビス (トリス (ヒドロキシメチル) -メチルアミノ) ブロバン)
BSA	牛血清アルブミン
CDR	相補性決定領域
ELISA	酵素結合免疫吸着アッセイ
Fv2	非共有一本鎖 Fv ダイマー

CC49PAB: 重鎖の N-末端領域に連結している完全軽鎖より成る CC49 の抗原結合性領域。

CC49scFv: ペプチドリンカーにより連結されている CC49 抗体の二本の可変ドメインより成る一本鎖抗体フラグメント。

CC49Fv2: ダイマーを構成するように非共有結合している 2 つの CC49scFv。Fv の後ろの数字は、表示の分子のモノマーサブユニットの数を意味する。例えば CC49Fv6 は六量体の多量体を意味する。

CC49scFv2: 3 つのリンカーにより連結されている、2 本の CC49V<sub>H</sub> ドメインと 2 本の V<sub>L</sub> ドメインとより成る共有結合型一本鎖抗体フラグメント。V<sub>L</sub> (L) と V<sub>H</sub> (H) ドメインとを連結し合わせるのに 6 つの可能な順序の組合せがある: LHLH, LHLH, LLHH, HLLH, HLHL 及び HHLH。

#### プラスミド

pSCFV UNH: 25 のアミノ酸リンカーにより連結されている、CC49 の可変重鎖と CC49 可変重鎖とより成る scFv についてのコード配列を含むプラスミド。

p49LHLH 又は p49LHHL: CC49scFv2 LHLH 又は LHHL 生成物のそれぞれを生成するためのコード配列を含むプラスミド。

#### 実施例

##### 一般実験

分子クローニングのための手順は、その開示内容を引用することによって本明細書に組入れる。Sambrook ら、Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Press, New York 第 2 版 (1989) 及び Ausubel ら、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, New York (1992) に記載の手順である。

ここで用いた水は全て脱イオン蒸留水とした。

オリゴヌクレオチドの合成及び精製

オリゴヌクレオチド(オリゴ)は全て、標準の $\beta$ -シアノエチルホスホラミジット及び合成カラムを用い、Applied Biosystems (Foster City, CA) 由来のModel 380A又はModel 391 DNA合成装置のいずれかで合成した。その生成物上の保護基は、濃水酸化アンモニウムの中で55℃で8~15時間加熱することにより除去した。水酸アンモニウムはエバポレーションを介して除去し、そしてその粗混合物を30~40 $\mu$ lの蒸留水の中に再懸濁させた。ポリアクリルアミド-尿素ゲル上での電気泳動の後、オリゴを短波紫外(UV)光を用いて可視化した。DNAバンドをゲルから切り出し、そして1mlの100mMのトリス-HCl, pH 7.4, 500mMのNaCl, 5mMのEDTAの中で65℃で2時間かけて溶解させた。最終精製は、DNAをSep-Pac(商標) C-18カラム (Millipore, Bedford, MA) に適用し、そして結合したオリゴを60%のメタノールで溶解させることによって行った。その溶解の体積を約50mlに下げ、そしてDNA濃度を260nm (OD<sub>260</sub>)での光学密度を測定することにより決定した。

制限酵素消化

制限酵素消化は全て、Bethesda Research Laboratories (Gaithersburg, MD), New England Biolabs, Inc. (Beverly, MA) 又はBoehringer Mannheim (BW, Indianapolis, IN)の酵素及び緩衝液を用い、その製造者の推奨する手順に従って実施した。消化させた生成物をポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)により分離させた。そのゲルをエチジウムブロミドで染色し、そのDNAバンドを短波UV光により識別させ、次いでそのDNAバンドを切り出した。そのグルスライスを、5mMのトリス、2.5mMの酢酸、1mMのEDTA, pH 8.0を含む透析チューブ (Union Carbide Corp., Chicago) の中に入れ、そしてMax Submarine電気泳動装置(Hoefer Scientific Instruments,

より測定した。scFv2の結合は、発色の同時低下を伴うビオチニル化CC49の結合の低下をもたらした。

SDS-PAGE及びウェスタンブロッティング

SDS-PAGE分析のためのサンプル(20 $\mu$ l)を、非還元用サンプル調製バッファSepasol 1(Integrated Separation Systems(ISS), Natick, MA)の中で5分間煮沸することにより調製し、そして10~20%勾配のポリアクリルアミド Daiichi Minigelにその製造者の仕様書(ISS)に従って載せた。

電気泳動は、Mini 2-ゲル装置(ISS)を用い、ゲル当たり55mAで、一定の電流で約75分を行った。ゲルをクマジーブリアントブルーR-250 (Bio-Rad, Richmond, CA) の中で少なくとも1時間染色し、次いで脱色した。分子量標準品は予め染められており (Mid Range kit, Diversified Biotech, Newton Center, MA)、そして下記のタンパク質を含んでいた: ホスホリラーゼb、グルタマートデヒドロゲナーゼ、オвалブミン、ラクト脱ヒドロゲナーゼ、炭酸アンヒドラーゼ、B-ラクトグロブリン及びチトクロームC。対応の分子量はそれぞれ95,000、55,000、43,000、36,000、29,000、18,400及び12,400である。

ウェスタン分析を行うとき、デュプリケートのゲルも泳動した。電気泳動後、ゲルの一方を陽極バッファ #1 (0.3Mのトリス-HCl, pH10.4) の中で15~20分平衡にした。Immobilon-P PVDF (ポリビニリデンジクロリン) 膜 (Millipore, Bedford, MA) をメタノールで2分処理し、そして水の中に2分浸した。その膜を次に陽極バッファ #1 の中で3分平衡にした。Milliblot-SDE 装置 (Millipore) を、ゲルの中のタンパク質をこの膜に転写するために用いた。一連の陽極バッファ #1 を陽極電極面の中央に載せた。Whatman 3MM 濾紙のシートを陽極バッファ #1 の中に浸し、そしてその電

CA) を用いて溶解させた。サンプル容量を Speed Vac濃縮器 (Savant Instruments, Inc., NY) で下げた。DNAをエタノール沈殿させ、そして滅菌水の中で再溶解させた。

酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)

Johnsonら, Can. Res., 46, 850-857 (1986)に実質的に記載の通りに調製した TAG-72抗原を、ポリビニルクロリド96穴マイクロタイタープレート (Dynatech Laboratories, Inc., Chantilly, VA) のウェルの上に一夜乾燥させることで吸着させた。そのプレートをPBS中の1%のBSAで31℃で1時間ブロックし、次いで200 $\mu$ lのPBS, 0.05%のツイーン50で3回洗った。25 $\mu$ lの試験抗体及び25 $\mu$ lのビオチニル化CC49 (1/20,000希釈率の1mg/mlの溶液) をウェルに加え、そしてそのプレートを31℃で30分インキュベートした。プレートに結合した TAG-72、ビオチニル化CC49、ストレプトアビジンアルカリホスファターゼの相対量、及び発色時間は、余計な抗体又はビオチニル化CC49がないように、しかもscFvによる競合を排除するのに十分なシグナルが得られるように実験的に決定した。陽性コントロールは5 $\mu$ g/mlのCC49及び10 $\mu$ g/mlのCC49Pabとした。陰性コントロールはPBS中の1%のBSA及び又は濃度Bとした。未結合のタンパク質を洗い流した。アルカリホスファターゼの結合された1:1000の希釈率のストレプトアビジン50 $\mu$ l (Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, AL) を加え、そしてそのプレートを31℃で30分インキュベートした。そのプレートを更に3回洗った。50 $\mu$ lのパーニトロフェニルホスフェート溶液 (Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, MD) を加え、そして発色反応を最低20分行わせた。scFv2結合の相対量をマイクロプレートリーダー (Molecular Devices Corporation, Menlo Park, CA) を用い404~450 nmでの光学密度スキャンに

極面の上に滑らかに置いた。陽極バッファ #2 (25mMのトリス, pH10.4) の中に浸した別の濾紙を一枚目の上に載せた。次に濡れたPVDF膜を加え、平衡ゲルをその上に載せ、そして最後に陰極バッファ (40mMのグリシン中の25mMのトリスHCl, pH9.4) の中に浸した濾紙のシートを加えることによってサンドイッチを作った。転写は250mMの定常電流 (初期電圧は8~20ボルトに範囲した) を用いて30分で進められた。

ブロットした後、その膜を水の中で簡単にすすぎ、そして20mlのブロック溶液 (トリス緩衝食塩水(TBS) 中の1%の牛血清アルブミン(BSA) (Sigma, St. Louis, MO)) を有する皿の中に入れた。TBSはPierce Chemical (Rockford, IL)より、予備秤量粉末として購入し、500mlの水を加えたとき、その混合物は25mMのトリス、0.15Mの塩化ナトリウム溶液、pH 7.6を供する。これらの膜を最少限1時間、室温でブロックし、そして20mlづつの0.5%のツイーン20洗浄液(TTBS)を用いて5分間3回洗った。TTBSを調製するには、0.5mlのツイーン20(Sigma)をTBSのリッター当たり混合した。使用したプローブ抗体は20mlのビオチニル化 FAID 14溶液とした(10 $\mu$ g/20mlの抗体バッファ)。抗体バッファは100mlのTTBS当たり1gのBSAを加えることにより作った。室温で30~60分ブロットした後、その膜を上記の通りTTBSで3回洗った。

次に、その膜を室温において30~60分、抗体バッファの中で1:500希釈率のアルカリホスファターゼの結合されたストレプトアビジン (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL) 20mlとインキュベートした。洗浄工程を上記の通り、この後繰り返した。発色反応の前に、膜を炭酸アルカリバッファ (20ml) の中で2分洗った。このバッファは0.1Mの炭酸水素ナトリウム、1mMのMgCl<sub>2</sub>・H<sub>2</sub>O, pH9.8とした。アルカリホスファターゼにとっ

での基質を作るため、ニトロブルーテトラゾリウム(NBT)クロリド(50mg, Sigma)を70%のジメチルホルムアミドの中に溶かした。5-ブromo-4-クロロ-3-インドイルホスフェート(BCIP)(25mg, Sigma)を別に100%のジメチルホルムアミドの中に溶かした。5-ブromo-4-クロロ-3-インドイルホスフェート(BCIP)(25mg, Sigma)を別に100%のジメチルホルムアミドの中に溶かした。これらの溶液も、Pronovaよりウェスタン発色剤として市販されている。発色のため、それぞれ120μlを上記のアルカリ溶液に加え、そして15分間反応させ、次いで発色剤からそれらを水で洗い流した。

#### ビオチニル化 FAID 14

FAID 14は、CC49に対して特異的な、ATCC No. CRL10256として寄託されているネズミの抗-イデオタイプ抗体(IgG2a, Kアイソタイプ)である。FAID 14をNygene Protein Aアフィニティーカラム(Yonkers, NY)を用いて精製した。製造者のプロトコールに従ったが、ただし溶離バッファーとして0.1Mのクエン酸ナトリウム、pH 3.0を用いた。画分を1.0Mのトリス-HCl pH 9.0を用いてpH~7に中和した。ビオチニル化反応は下記の通りに設定した。FAID 14(1mg、水の中で100μl)を100μlの0.1MのNa<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、pH 9.6と混合した。ビオチニル-e-アミノ-N-カブロン酸N-ヒドロキシスクシニミドエステル(Biotin-X-NHS)(Calbiochem, LaJolla, CA)(2.5mg)を0.5mlのジメチルスルホキシドの中に溶かした。Biotin-X-NHS溶液(20μl)をFAID 14溶液に加え、そして22℃で4時間反応させた。過剰のビオチン及び不純物を、Pharmacia Superose 12 HR10/30カラム(Piscataway, NJ)を用いてゲル濾過により除去した。0.8μl/minの流速で、ビオチニル化FAID 14は16.8minのピークで出現した。このピークを構成する画分をブールし、そして4℃で保存し、そしてCC49V<sub>1</sub>及びV<sub>2</sub>CDRにより決定

されるCC49イデオタイプを検出するのに用いた。

#### 等電点電気泳動(IEP)

等電点(pI)は、DNASTAR(Madison, WI)を介して入手できるPROTEIN-TITRATEという名のコンピュータプログラムを用いて推定した。入力してある配列によるアミノ酸組成に基づき、pIに加えてpI値が得られた。Cys残基は電荷に寄与するため、Cysについての計数は0に調整し、なぜならそれらは全てジスルフィド結合に関与するからである。

実験的にpIを、IsogelアガロースIEFプレート、pH域3~10(FMC Bioproducts, Rockland, ME)を用いて決定した。Biorad Bio-phoresis 水平電気泳動セルを、IEFを行うのに用い、両者の製造者の仕様書に従った。電気泳動条件は、500ボルト(限界)、20mAの電流及び10Wの定常電力とした。等電点泳動は90minで完了した。IEF標準品はBioradより購入した。そのキットはフィコシアニン、β-ラクトグロブリンB、牛炭酸アンヒドラーゼ、ヒト炭酸アンヒドラーゼ、馬ミオグロビンヒトヘモグロビンA及びC、3レンデルレクテン及びチトクロームCを含み、それらのpI値は4.65, 5.10, 6.00, 6.50, 7.00, 7.10及び7.50, 7.80, 8.00並びに8.20及び8.60である。ゲルを、FMCにより供給された仕様書に従って染色及び脱色した。

#### CC49抗体種の定量

IgG, scFv2の種および単量体scFvを含む精製CC49抗体はすべて、適合している1.0cm光路長の石英製キュベット(Hellma社)およびPerkin-Elmer UV/VIS分光光度計552A型を用いて、タンパク質希釈液の280nm波長光の吸光度を測定して定量した。モル吸光係数(E<sub>1</sub>)は、各抗体について、下記式を用いて測定した。

$$E_1 = (\text{Tyr数}) \times 5,500 + (\text{Tyr数}) \times 1,340 + ((\text{Cys} \text{ 2数}) \times 150 + (\text{Phe数}) \times 10)$$

これらの値は、D. B. Watlafer, Advances in Protein Chemistry, 17巻、375~378頁に記載されている情報に基づいている。

#### 高性能液体クロマトグラフィー

CC49scFv2を精製するために行った高性能液体クロマトグラフィーにはすべて、金体にチタンまたはテフロン配管を用いたLKB HPLCシステムを使用した。このシステムは、2150型HPLCポンプ、2152型制御器、276nmの吸光度に設定されたUV CORD SII 2238型検出装置および2211型SuperRac fraction collectorで構成されている。

#### サブユニットのPCRによる製造

ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)はすべて、150ピコグラム(pg)のプラスミド標的(pSCFVUHM)：100ピコモルのプライマー：1μlのPerkin-Elmer-Cetus社(米国、コネティカット州、ノーウォーク所在)のAmpli-Tagポリメラーゼ；16μlの10mM dNTPおよび10μlの10×緩衝液(両者ともにPECキットに提供されている)；ならびに合計容積を100μlにするのに十分な水で構成された反応混合物で行った。PCR反応はメーカーが記載しているのほとんど同様にして行った。これらの反応は、PEC 9600型サーモサイクラー(thermocycler)を用いて30サイクル行ったが、その1サイクルは、94℃で20~45秒間のDNAの変性；52~60℃で0.5~1.5分間のアニーリングおよび72℃で0.5~2.0分間の伸長で構成されている。オリゴヌクレオチドのプライマーは、Applied Biosystems社(米国、カリフォルニア州、ホスター・シティ所在)の3EQ4型もしくは591型DNA合成器で合成し次いで上記のようにして精製した。

#### リゲーション

100ngのベクターDNAおよび対応する1：1化学量論的当量のインサートDNAを用いるリゲーション反応を、Stratagene社(米国、

カリフォルニア州、ラ・ホーヤ所在)のT4 DNAリガーゼキットを用い、該メーカーの指示にしたがって行った。リゲーション反応物(全容積20μl)は最初18℃でインキュベートし、次いで一夜4℃まで徐々に冷却した。

#### 形質転換

形質転換は、100μlのStratagene社の大腸菌(E. coli) AG1コンピテント細胞(米国、カリフォルニア州、ラ・ホーヤ所在のStratagene社)を用い、メーカーの指示によって行った。上記リゲーション反応物由来のDNA(1~5μl)を使用した。形質転換ステップの後、細胞は、混合を続けながらルリアブロス(LB)中で37℃で1時間再生させ、続いて、pSCFVUHM, p49LHLHもしくはp49LHHLに用いる20μg/mLのクロラムフェニコール含有(CAM20)ルリア寒天上にプレートし、またはプラスミドpSL301を含有するクローンもしくはpSL301由来のその後の構築物に用いる100μg/mLアンピシリン(AMP100)ルリア寒天プレート(LB-AMP100)上にプレートした。

#### 大腸菌クローンのスクリーニング

細菌プラスミドは、Progene社(米国、ウィスコンシン州、マディソン所在)のMagicミニ-ブレイクプラスミド製造キットを用いて、高圧圧(selection pressure)を維持するため適切な薬剤を含有するLBブロス培養液から単離した。このキットはメーカーの取扱い説明書にしたがって使用した。

#### プラスミドの構築

p49LHLHおよびp49LHHLと命名された2種のプラスミドを、多価の一本鎖抗体を製造するために構築した。p49LHLHを含有する宿主細胞は、V<sub>H</sub>-L-V<sub>H</sub>-L-V<sub>H</sub>-L-V<sub>H</sub>で表すことができるポリペプチドを産生した。ここでV<sub>H</sub>とV<sub>L</sub>はCC49抗体の軽鎖と重鎖の可変領域であり、およびリンカー(L)は、下記SEQ ID NO: 5の配列を有する

25位のアミノ酸のリンカーである。

Leu-Ser-Ala-Asp-Asp-Ala-Lys-Lys-Asp-Ala-Ala-Lys-Lys-Asp-Asp-Ala-Lys-Lys-Asp-Asp-Ala-Lys-Lys-Asp-Leu

p49LHHLを含有する宿主細胞は、V<sub>L</sub>-L-V<sub>H</sub>-L-V<sub>L</sub>-L-V<sub>H</sub>で誘導することができるポリペプチドを産生した。ここでV<sub>L</sub>とV<sub>H</sub>はCC49抗体の軽鎖と重鎖の可変領域であり、およびしは上記アミノ酸配列を有するペプチドリンカーである。

CC49V<sub>L</sub>-L-V<sub>L</sub>-L-V<sub>L</sub>-L-V<sub>H</sub>(p49LHHL)のヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 6)とアミノ酸配列(SEQ ID NO: 7)を図6に示す。CC49V<sub>L</sub>-L-V<sub>H</sub>-L-V<sub>L</sub>-L-V<sub>H</sub>(p49LHHL)のヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 8)およびアミノ酸配列(SEQ ID NO: 9)を図7に示す。

#### pSL301HTの構築

pSL301HTの構築を図8に示す。バシラス・リヘニフォルミス(*Bacillus licheniformis*)のペニシリナーゼP (penP) ターミナーターの配列を、NheIおよびBamHIで45分間消化することによって、pSCFV UHMと命名されたプラスミドから取出し、電気泳動を行った後、4.5%ポリアクリルアミドゲルから切り取り、電気泳動させ、エタノールで沈殿させ、次に、同様に製造されたベクター：pSL301 (米国、カリフォルニア州、サンディエゴ所在のInvitrogen社)中の同じ部位に連結した。pSCFV UHMの製造手順は、1992年8月21日付け出版の米国特許第07/935,695号に記載されている。なおこの出版の開示事項は本願に採用するものである。一般に、pSCFV UHMは、penPプロモーターのヌクレオチド配列：固有NcoI制限部位；CC49V<sub>L</sub>領域；HindIII制限部位；25位のアミノ酸のリンカー；固有XhoI制限部位；CC49V<sub>H</sub>領域；NheI制限部位；penPターミナーター；およびBamHI制限部位を含有している(図8参照)。このpenPプロモーターとpenPターミナーターは、Mezesら、J. Biol. Chem., 258巻、

11211~11218頁、1983年に記載されている。

上記のリゲーション反応物の一部(3 μL)を、LB-AMP100寒天プレート上にプレートし、次いで一夜増殖させたコンピテント大腸菌AG1細胞を形質転換するのに用いた。penPターミナーター、インサートを含有するポテンシャルクローンを、Pharmacia社(米国、ネリーランド州、ガイサズバーグ所在)のT7 Quickprime <sup>32</sup>P DNA標識キットと、Bulowelsら、Nucleic Acid Research, 17巻、452頁、1989年に記載されているマイクロ法によるコロニー溶融法をもに用いてスクリーニングした。プローブは、penP-NheI-BamHIターミナーターフラグメント自体であるが、Quickprimeキットによって提供された指示によって製造し使用した。陽性プローブであり、かつBamHIおよびNheIによる消化物由来の207個の塩基対挿入断片(図6に示す1958~2165の塩基対(bp))を含有するクローンをpSL301Tと命名し、次いでCC49VHに対するヌクレオチド配列を含有するpSL301HTを構築するのに選択した。NheI-BamHI penPターミナーターをpSL301中に配置した理由は、そのNheIとBamHIの部位の間のポリリンカー領域中に存在するEco47III制限エンドヌクレアーゼ部位を除くためであった。このことは、Eco47III部位が、構造体中に各連続V領域を配置するのにユニークである必要があるV<sub>L</sub>とV<sub>H</sub>の領域を縫って構築するため設計された。各V領域がEco47III-NheI部位に付加されると、Eco47IIIは各場合に破壊されて、ユニーク挿入断片に入ってくる次のEco47III部位を形成した。

V<sub>L</sub>配列は、PCR増幅の標的としてpSCFV UHMを用い、オリゴの5' SCP1と3' オリゴSCP5によってPCRで作製した。SCP1に対するDNA配列(SEQ ID NO: 10)とSCP5に対するDNA配列(SEQ ID NO: 11)は次のとおりである。

SCP1: 5' -TAA CAC GAT GAT TTT CAG CAG CAG-3'

SCP5: 5' -TAA CAC GAT GAT TTT CAG CAG CAG-3'

下線をつけた部分はエンドヌクレアーゼ制限部位を示す。

増幅されたV<sub>L</sub>DNAを、4%のPAG、電気泳動、エタノールによる沈殿および20 μL水への溶解によって精製した。そのV<sub>L</sub>配列をXhoIとNheIの制限酵素で消化し、同じ制限酵素で消化され縫って精製されたpSL301Tベクターに対するインサートとして用いた。標準のリゲーション反応を行い、次いで一部分(4 μL)を用いてコンピテント大腸菌AG1細胞を形質転換させた。形質転換された細胞を、LB-AMP100寒天プレート上にプレートした。CC49V<sub>L</sub>インサートを含有していることを示す候補的クローンをNheIおよびXhoI消化スクリーンから取出した。

United States Biochemical (USB) 社(米国、オハイオ州クリーブランド所在)のSequence Kit、および配列決定用プライマーpSL301SEQB (pSL301ベクター中、XhoI部位から57bp上流においてアニールした21bpの配列決定プライマー)とCC49VHPを用いて、DNAの配列決定を行って、CC49V<sub>L</sub>の配列を確認し、pSL301HT中に正しいCC49V<sub>L</sub>配列を有するクローンを明らかにした。このプラスミドはpSL301-HLHTおよびpSL301-HLHTの両者を構築するときの出発点で使用した。使用した配列決定用のオリゴをここに示す。

pSL301SEQB(SEQ ID NO: 12)およびCC49V<sub>L</sub>(SEQ ID NO: 13)のオリゴヌクレオチド配列は次のとおりである。

pSL301SEQB: 5' -YCG TCC GAT TAG GCA AGC TTA-3'

CC49VHP: 5' -GAT GAT TTT AAA TAC AAT GAG-3'

#### 実施例1 p49LHHLの構築

pSL301HT (5 μg)を出発物質として用い、これをEco47IIIおよびNheIで消化し、大きい方のベクターフラグメントを精製した。CC49V<sub>L</sub>挿入フラグメントは、5' オリゴとしてSCP5Cを用い、かつ

3' オリゴとしてSCP5を用い、PCRによって製造した。SCP5Bのヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 14)は下記の通りである。

SCP5B: 5' -TAA TGC GCA GAT GAC GCA AGC AAA GAC GCA GCT AAA AAA GAC GAT GGC AAA AGC GAT GAC GGC AGC AAA GAT CTT GAG GTT CAG TTT CAG CAG TCT-3'

またオリゴSCP5Bはリンカーのコーディング領域の一部(SEQ ID NO: 14のbp 8~76)を含有している。pSCFV UHM中のCC49VH標的でアニールするよう設計された該オリゴの部分は、SEQ ID NO: 14中のbp 77~80由来のものである。

下線をつけた配列はPspI部位に相当する。得られたPCRインサートを精製し、FspIとNheIで消化し、次いでpSL301HT Eco47III-NheIベクターとのリゲーション反応に用いた(図7)。コンピテント大腸菌AG1細胞を、このリゲーション反応物(8 μL)で形質転換を行うのに用い、LB-AMP100寒天プレート上にプレートした。pSL301HT生成物を示す正しい大きさのXhoI-NheIインサートを有する2個のクローンの配列をオリゴSCP1を用いて決定し、正しい配列(図7のヌクレオチド1124~1543)を有する単クローンをその後の構築に用いるのに選んだ。SCP1のヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 16)は下記の通りである。

SCP1: 5' -TG ACT TTA TGT AAG ATG ATG T-3'

最終のリンカーV<sub>L</sub>サブユニット(bp1544~1983、図7)は、5' オリゴのSCP7bと3' オリゴのSCP8aを用い、かつPCRの標的としてpSCFV UHMを用いて製造した。SCP7bのヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 17)は下記の通りである。

SCP7b: 5' -TAA TGC GCA GAT GAC GCA AGC AAA GAC GCA GCT AAA AAA GAC GAT GGC AAA AGC GAT GAC GGC AGC AAA GAT CTT GAG ATT GTC ATG TCA CAG TCT CC



下線をつけたヌクレオチドは FspI 部位である。SCP8aのヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 18) は下記の通りである。

SCP8a: 5' -TAAA GCT AGC TTT TTA CTT AAG CAC  
CAG CTT GGT CCC-3'

下線をつけた最初の一組は NheI 部位に相当し、もう一つの組は AflII 部位に相当する。SCP70のヌクレオチド 8~76はリンカーをコードし(図7のヌクレオチド1544~1612)、一方V<sub>L</sub>にアニールするヌクレオチド77~99は図7の1613~1635に相当する。プライマー SCP8aは、その5'末端の短いテール、NheI 制限部位、終止コドン、AflII 制限部位およびV<sub>L</sub>の最後の21個の塩基を含有している。FspI と NheI による消化の後、この得られた 420bpのインサートを精製して複製pSL30HHTベクターの NheI と Eco47IIの部位に連結し、候補的なクローンを NheI と XhoI でスクリーニングし、正しい大きさのインサートが確認されかつ49LFR2 (-)とSQP1で配列が決定されて、pSL301HHT中に新たに挿入された配列が確認された。そのヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 19) は下記の通りである。

49LFR2 (-): 5' -CTG CTG GTA CCA GGC CAA G-3'

プラスミドpSL301HHTを XhoI および NheI で消化し、精製し、得られた1178bp V<sub>L</sub>-リンカー-V<sub>L</sub>-リンカー-V<sub>L</sub>セグメントを pSCPV UHMに連結して p49LHHLを製造した。なおこの pSCPV UHMは同じ制限酵素で切断されその大きい方のフラグメントを精製したものである。そのリゲーション反応生成物(4 μl 部分)を用いてコンピテント大腸菌AG1細胞(Stratagene社)を形質転換し、LBCAM20 寒天プレートにプレートした。正しい制限酵素地区を有するプラスミドを含有する単クローンを、p49LHHLを含有させるために選択した。p49LHHLは、CC49多価一本鎖抗体 scFv2: V<sub>L</sub>-L-V<sub>H</sub>-L-V<sub>H</sub>-L-V<sub>L</sub> またはCC48scFv2 (LHHL)のpenPプロモーターとヌクレオチ

D配列を含有している。

#### 実施例2: p49LHHLの構築

p49LHHLの構築を図11に図式的に示す。リンカー-V<sub>L</sub>のサブユニットを5'オリゴの SCP7bと3'オリゴのSCP9で製造した。

SCP9: 5' -TAA AGC TAG CAC CAA GCG CTT AGT TTC  
AGC ACC AGC TTE GTC CCA G-3'

SCP7bオリゴ(ヌクレオチド8~76)は図6のリンカーをコードし(ヌクレオチド1124~1192に相当する)および図6のV<sub>L</sub>のヌクレオチド1193~1215に相当する。PCRに対する pSCPV UHM標的(ヌクレオチド77~99)にアニールした。

SCP8aは、NheI 部位(第一の下線をつけたヌクレオチド)と Eco47II 部位(第二の下線をつけたヌクレオチド)を有し、これらの部位は次のV領域を受けるための pSL301HHTを作るのに必要な制限部位である。SCP9のヌクレオチド18~23は図6のヌクレオチド1532~1537(リンカーの最初の2個のアミノ酸をコードしている)に相当し、一方ヌクレオチド24~46は、PCRにおけるSCP9のアニール領域である図6に示すヌクレオチド1508~1531に相当する。プラスミドpSL301HHTを Eco47II と NheI で消化し、そしてその大きい方のベクターフラグメントは精製して、予め FspI と NheI で処理され精製された、PCRからのリンカー-CC49V、DNAインサートと連結させる。その連結混合物(3 μl)を用いて大腸菌AG1 コンピテント細胞を形質転換し、次いで正しい XhoI - NheI の大きさのフラグメントを有する一つのコロニーの配列をオリゴ PENPTSEQ2を用いて決定した。そのヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 21) は下記の通りである。

5' -TTG ATC ACC AAG TGA CTT TAT G-3'

配列決定の結果は、得られたpSL301HHTクローン中に PCRの誤まり

と欠失があるということを示した。図6にみられるヌクレオチド1533~1537に相当する5個の塩基の欠失がみとめられ、そしてTであるべきはずのヌクレオチド1531はDNA配列のデータから確認したところ実際にはGであった。得られた配列は、

5' ...GAAGCGCTT...であった。

こゝで下線をつけた配列は偶然に Eco47II 部位を形成した。図6のAGCGCTの配列はヌクレオチド1530, 1531, 1532, 1538, 1539および1540に相当する。この誤まりは次のステップで修正され、オリゴ SCP8Cの末端に5塩基の欠失を組込むことによってpSL301HHTを製造した。

SCP8C: 5' -TAAGCGCTGATGATGCTAAGAGGACGCCGCAAAAAA  
GGACGACGCAAAAAAGATGATGCAAAAAAGGATCTGG  
AGGTTCACTTCCAGCAGTCTGAC-3'

SCP8C中の下線をつけた配列は Eco47II 部位に相当する。PCRにおいて、SCP8Cは5'オリゴとして用いられ一方 SCP10は3'オリゴとして用いられ、リンカー-CC49V、セグメントが生成する。

SCP10のヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 23) は下記の通りである。

SCP10: 5' -TTG TGC TAG CTT TTT ATG AGG AGA CGG TGA  
CTG AGG TT-3'

SCP10中の下線をつけた配列は図8のヌクレオチド1958~1963に見られる NheI 部位に相当する。この場合、PCRインサートはNheI だけで消化され次いで精製される。ベクター(pSL301HHT)はEco47II 部位(先に形成されている)および NheI 部位で消化され次いで精製された。そのインサートとベクターは連結され、その一部分(3 μl)を使ってコンピテント イー・コリAG1細胞を形質転換した。この形質転換細胞をLB-AMP100プレート上にプレートし次いで候補的クローンを XhoI と NheI でスクリーニングした。正しい大きさ

のDNAを有する3個のクローンを得た。これらのクローンのうちの2個は、オリゴ49VLCDSR(+)およびSQP1を用いて配列を決定した。そのヌクレオチド配列(49VLCDSR(+))のDWQ ID NO: 24) は下記の通りである。

49VLCDSR(+): 5' -CAG CAG TAT TAT AGC TAT-3'

正しい配列を有する一つのクローンが得られ、そして図6のヌクレオチド1533~1963からの配列が確認され、正しいpSL301HHTクローンを示した。

大腸菌中で発現させるのに用いる最終的なプラスミド p49LHHLを製造するために、pSL301HHT(5 μg)を NheI と XhoI で消化し、次いでV<sub>L</sub>-L-V<sub>L</sub>-L-V<sub>H</sub>配列を含有する小さい方のインサートを精製した。この断片を、pSCPV UHM(5 μg)を XhoI と NheI で消化して得た大きい方のベクターフラグメントの精製物と連結した。上記連結混合物の一部(4 μl)を使ってコンピテント大腸菌AG1細胞を形質転換した。得られた形質転換混合物をLB-CAM20 プレート上にプレートし、次いで p49LHHLに対する代表的なクローンを、正しい制限酵素地図(図10参照)および TAG-72に対する生物活性に基づいて選択した。

#### 実施例3 CC49 scFv2のLHLHとLHHLが共有結合した二量体の精製

CC49の共有結合した一本鎖二量体(scFv2)の精製を行うために、大腸菌のペリプラズマ細胞質の固分を、p49LHHLと p49LHHLの両者の1.0Lの一夜培養物から調製した。要約すると、培養物を250mL づつの4部分に分割し、Sorvall GS-8 ロータで10分間 5000rpmで遠心分離した。ペレット化した細胞を洗浄し、30mM NaClを含有する10mM トリス-HCl pH 7.3からなる100mL中に再懸濁させた。細胞を再びペレット化し、合計100mLの30mM トリス-HCl pH 3で洗浄し、そして一つのチューブにブールした。このチューブに、40w/v %

のスクロースを含有する30mMトリス-HCl pH 7.3(100mL)および10 mM EDTA pH 7.5(2.0mL)を添加した。得られた混合物を、時々攪拌しながら、室温に10分間保持した。高張性細胞(hypertonic cell)を前記のようにしてペレット化した。次のステップでショックを与えて、該ペレットを20mLの氷冷 0.5mM MgCl<sub>2</sub>中に速やかに懸濁させ、次いで時々攪拌しながら氷上に10分間保持した。その細胞を前記のようにしてペレット化し、大腸菌の周辺細胞質の画分を含有する上澄み液を、0.2μmのNalge社(米国、ニューヨーク州、ロチェスター所在)の濾過装置で濾過することによってさらに清澄にし、次いでAmicon社(米国、マサチューセッツ州、ダンバース所在)のCentricon 30およびCentricon 30で1.0mLより小さい容積まで濃縮した。

p49LHLHまたはp49LHLHのクローン由来の濃縮周辺細胞質のショック(Shockate)を、Pharmacia社(米国、ニュージャージー州、ピスカタウェイ所在)のSuperdex 75 HR 10/30 HPLCカラム(予めPBSで平衡化させたもの)に注入した。競合ELISA法で測定する場合、問題の生成物は0.5mL/分の流量で21~24分間放出させた。活性画分をブールし、先に述べたようにして濃縮し、次に、システム500 Microdialyzer Unit(Pierce Chemical社)を用い、緩衝液を3~4回戻しながら8000MWカットオフ膜を使用して、20mMトリス-HCl pH 7.6に対して一夜透析を行った。その試料をPharmacia社のMono Q HR 5/5アニオン交換HPLCカラムに注射した。緩衝液Aとして20mMトリス-HCl pH 7.6を用い、緩衝液Bとして20mMトリス-HCl pH 7.6+0.5M NaClを用いる勾配プログラムを、1.5mL/minの流量で使用した。問題の生成物は、競合ELISA法で測定する場合、各々3~4分間カラムから放出させた。この時点の画分の、二つのSDS-PAGEゲルによる分析で、一方のゲルはクマシーブリアン

トブルーR250で染色し、他方のゲルはウェスタン分析(ブローブ抗体としてビオチニル化FAID 14を使用)に移されたが、scFv2(LHLHまたはLHEL)の種の計算分子量の単一バンドが、58,239ダルトンの位置に出現した。活性画分は各場合濃縮し、50mM MES pH 5.8に対して一夜透析し、次いでPharmacia社のMono S HR 5/5カチオン交換カラムに注射した。この精製ステップからの問題の二つの画分の5と6は、SDS-PAGE法およびELISA法で測定する場合、勾配液の使用が開始される直前に溶出された。したがってこれらの画分は実際にはカラムに結合していなかったわけである。次いで画分5と6はさらに精製するためにブールした。

Mono Qカラムを活性Mono S画分について再度使用したが使用した緩衝液は20mMトリス-HCl pH 8.0であり、流量は0.6mL/分に低下させた。生成物はカラムとの結合なしで放出されたが、Mono Sに残っている不純物がわずかにあり、したがって分離は5~6分間かかった。この処理を行った後、生成物は均質であり以後の特性決定のために貯蔵した。

#### 等電点電気泳動

精製性の等電点(pI)はDNASTAR社(米国、ウィスコンシン州、マディソン所在)のコンピュータプログラムProtein-Titrateを使用して予測した。アミノ酸組成、MWおよびpI値に基づいて計算した。

試験では、pIは、FMC BioProducts社(米国、メーン州、ロックランド所在)のIsogel IEPプレートpH範囲3~10を使用して測定した。上記IEFを操作するために、Biorad社(米国、カリフォルニア州、リッチモンド所在)の電気泳動装置を、上記両メーカーの指示にしたがって使用した。その電気泳動の条件は、20mAで500V(限定)および一定電力の10Wであった。等電点電気泳動は90分間で完了した。Biorad社のIEP標準品は、フィコシアニン、βラクトグロ

ブリンB、ウシカルボニックアンヒドラーゼ、ヒトカルボニックアンヒドラーゼ、ウマミオグロブリン、ヒトヘモグロビンAとC、3種のヒラマメレクチンおよびシトクロムCが含有され、pI値はそれぞれ4.65, 5.10, 6.00, 6.50, 7.60, 7.50, 7.8, 8.00, 8.20および8.6であった。ゲルはFMCの指示にしたがって染色し脱色した。DNASTARプログラムによって両方のscFv2の種のpI値として8.1の値が予測された。純品の生成物に対し単一の均一なバンドがゲル上に、両者のpI値の6.9の位置にみとめられた。

IgG, scFv2(LHLHおよびLHEL)のような精製CC49抗体は、280nm波長光の吸光度を分光学的に測定することによって定量した。モル吸光係数E<sub>m</sub>は各々、先に引用したWellawferの式を用いて測定した。

そのアミノ酸組成に基づいて、CC49IgG, CC49scFv2LHLH, CC49scFv2LHELおよびCC49scFvのE<sub>m</sub><sup>280nm</sup>(280nm)値はそれぞれ1.49, 1.65, 1.65および1.71であった。

#### 実施例4

CC49scFv2の種のLHLHとLHELの相対活性を、IgGおよびCOOH末端にFLAGペプチドを有する単量体scFv型と比較した。

パーセント競合(percent competition)を下記式によってELISAのデータから求めた。

$$\frac{\text{ゼロ競合-試料競取值 (OD 405-450nm)}}{\text{ゼロ競合-100\%競合}} \times 100$$

“ゼロ競合(zero competition)”値は、1% BSAをビオチニル化CC49(3×10<sup>10</sup>~14モル)と1:1比率で混合して測定し、一方100%競合値はビオチニル化CC49IgGと混合したCC49IgGの5μg/mL試料に基づいた値である。これらのデータは図11に示す。試料の吸光度値は405nm~450nmで測定した。3回の競取值の平均値を使

用した。最初に試料(25μL)を、TAG-72でコートしたマイクロリットルプレートに、1.0×10<sup>10</sup>モルの結合部位/mLで塗布した。ビオチニル化CC49(4μg/μL: 20,000に希釈、25μL使用)で試料を1/2濃度に希釈した。連続希釈法(1:2)を行った。両方の形態のscFv2はIgGにほぼ等しい(図11参照)。別の試験で、CC49scFv単量体をFabフラグメントと比較した。両者は一価であるが、これらはTAG-72に対する結合アフィニティが等しいことを示した。これらの結果は、共有結合の二量体の両者の形態は、二つの充分に機能的な抗原結合部位をもっていることを示している。これは、単量体の種に比べて全IgGについてみられるのと同じ結合力の増大である。

またこれらのデータは、scFv2分子が、そのCC49IgGの親と同様に、免疫治療用途の候補であり、毛細血管透過性の増大および一層迅速な生体分布薬物動態の利点を有することを示している。この利点によって、既存のIgG分子に比べて、本発明の化合物は多数回注射することができ、かつ癌治療に用いる免疫治療法において腫瘍:組織比を高くすることができる。

本発明の他の実施態様は、本明細書を検討するかまたは本願に開示されている発明を実施することから、当該技術分野の当業者にとって明らかになるであろう。本明細書と実施例は例示だけを目的とするもので、本発明の真の適用範囲と思想は以下の特許請求の範囲によって示される。

以上

特許(内容に変更なし)

FIGURE 1

共有及び非共有結合型一本鎖Fv多量体の図解

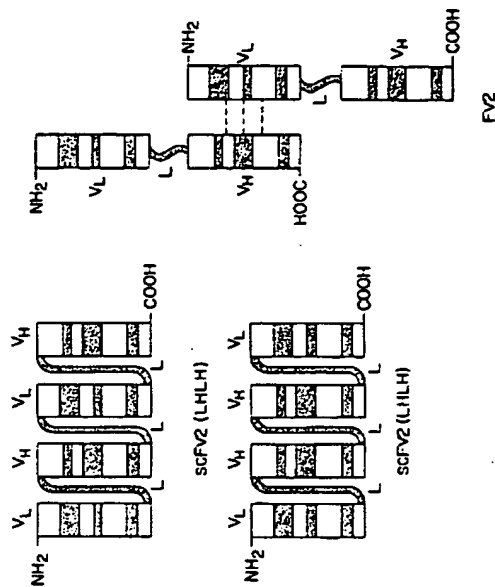


FIG. 2

GAC ATT GTG ATG TCA CAG TCT CCA TCC TCC CTA CCT GTG TCA  
 GTT GGC CAG AAG GTT ACT TTG AGC TGC AAG TCC AGT CAG AGC  
 CTT TTA TAT AGT GGT AAT CAA AAG AAC TAC TTG GGC TGG TAC  
 CAG CAG AAA CCA GGC CAG TCT CCT AAA CTG CTG ATT TAC TGG  
 GCA TCC GCT AGG GAA TCT GGG GTC CCT GAT CGC TTC ACA GGC  
 AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC TCC ATC AGC AGT GTG  
 AAG ACT GAA GAC CTG GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG TAT TAT  
 AGC TAT CCC CTC ACG TTC GGT GCT GGG ACC AAG CTG GTG CTG  
 AAG

FIG. 3

Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Pro Val Ser Val  
 Gly Glu Lys Val Thr Leu Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu  
 Tyr Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys  
 Pro Gly Cln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ala Arg  
 Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr  
 Asp Phe Thr Leu Ser Ile Ser Ser Val Lys Thr Glu Asp Leu Ala  
 Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly  
 Ala Gly Thr Lys Leu Val Leu Lys

FIG. 4

GAG GTT CAG TTG CAG CAG TCT GAC GCT GAG TTG GTG AAA CCT  
 GGC GCT TCA GTG AAG ATT TCC TGC AAG GCT TCT GGC TAC ACC  
 TTC ACT GAC CAT GCA ATT CAC TCG GTG AAA CAG AAC CCT GAA  
 CAG GGC CTG GAA TGG ATT GGA TAT TTT TCT CCC GGA AAT GAT  
 GAT TTT AAA TAC AAT GAG ACG TTC AAG GGC AAG GCC ACA CTG  
 ACT GCA GAC AAA TCC TCC AGC ACT GCC TAC CTG CAG CTC AAC  
 AGC CTG ACA TCT GAG GAT TCT GCA GTG TAT TTC TGT ACA AGA  
 TCC CTG AAT ATG GCC TAC TCG GGT CAA GGA ACC TCA GTC ACC  
 GTC TCC TCA

FIG. 5

Glu Val Cln Leu Cln Cln Ser Asp Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly  
 Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr  
 Asp His Ala Ile His Trp Val Lys Cln Asn Pro Glu Cln Gly Leu  
 Glu Trp Ile Gly Tyr Phe Ser Pro Gly Asn Asp Asp Phe Lys Tyr  
 Asn Glu Arg Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser  
 Ser Ser Thr Ala Tyr Val Cln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp  
 Ser Ala Val Tyr Phe Cys Thr Arg Ser Leu Asn Met Ala Tyr Trp  
 Gly Cln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

特許(内容に変更なし)

FIGURE 6

CCAG VL-L-VH-L-VH-L-VH/DNA及びP3ミノ鎖配列

5'-C TCA TGT TTG ACA GCT TAT CAT CGA TGA ATT CCA TCA TCA CTT CCC TCC 46  
 GTT CAT TTG TCC CCG GTG GAA ACG AGG TCA TCA TTT CTT TCC GAA AAA 94  
 ACG GTT GCA TTT AAA TCT TAC ATA TAT AAT ACT TTC AAA GAC TAC ATT 142  
 TGT AAG ATT TCA TGT TTG AGT CCG CTG AAA GAT GGT ACG TAC CAA TTA 190  
 TTG TTT GGT GAT TGT TCA TCA ACG CAT AAC ACT GTA GGG ATA GTG GAA 238  
 GTG CTT CAT CTG GTT ACG ATC AAT CAA ATA TTC AAA CCG ACG GAG ACG 286  
 -32  
 Met Lys Trp Leu Leu Pro Thr Ala Ala Cln Gly Leu Leu  
 ATT TTG ATG AAA TAC CTA TTG CCT ACG GCA GGC GGT GGA TTG TTA TTA 334  
 VL  
 Neo I  
 Leu Ala Cln Pro Ala Met Ala Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro 382  
 CTC CTT GGC CAA CCA CCC ATG GCC GAC ATT GTG ATG TCA CAG TCT CCA  
 10  
 Ser Ser Pro Val Ser Val Gly Glu Lys Val Thr Leu Ser Cys Lys  
 TCC TCC CTA CTT GTG GGT GGC GAC AAG GTT ACT TTG AGC TGC AAG 430  
 30  
 Ser Ser Cln Ser Leu Leu Tyr Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala  
 TCC ACT CAG ACC CTT TTA TAT ACT GGT AAT CAA AAG AAC TAC TTG GCC 478

FIG. 6D

Phe Cys Thr Arg Ser Leu Asn Met Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser  
 TTC TGT ACA ACC TCC CTC AAT ATG GCC TAC TGG GGT CAA G  
 240  
 Val Thr Val Ser Ser Leu Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys Asp Ala Ala  
 GTC ACC GTC TCC TCA CTA AGC GCA GAT GAC GCA AAG AAA GAC GCA GCT  
 250  
 Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Leu Asp Ile  
 AAA AAA GAC GAT GGC AAA AAG GAT GAC GGC AAG AAA GAT GTT GAC ATT  
 260  
 Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Pro Val Ser Val Gly Gln Lys  
 GTG ATG TCA CAG TCT CCA TCC TCC CTA GCT GTG TCA GTT GGC GAG AAG  
 270  
 Val Thr Leu Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Gly Asn  
 GTT ACT TTG AGC TGC AAG TCC AGT CAG AGC CTT TTA TAT AGT GGT AAT  
 280  
 Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Tyr Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro  
 CAA AAG AAC TAC TTG GCC TCG TAC CAG CAG AAA CCA GCG CAG TCT CCT  
 290  
 300  
 310  
 320

FIG. 6B

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp  
 TGG TAC CAG CAG AIA CCA GCG CAG TCT CCT AAA CTC CTC ATT TAC TGG  
 50  
 Ala Ser Ala Arg Gln Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly  
 GCA TCC GCT AGG GAA TCT GGG CTC CCT GAT GCG TTC ACA GCG ACT GCA  
 60  
 Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Ser Ser Val Lys Thr Gln Asp  
 TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC TCC ATC AGC AGT GTG AAG ACT GAA GAC  
 70  
 Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe  
 CTG GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG TAT TAT AGC TAT CCC CTC ACC TTC  
 80  
 Gly Ala Gly Thr Lys Leu Val Leu Lys Leu Ser Ala Asp Asp Ala Lys  
 GGT GCT GCG ACC AAG CTG GTG CTC GAG CTT AGT GCG GAC GAT GCG AAA  
 90  
 100  
 110  
 120  
 130  
 Lys Asp Ala Ala Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys  
 AAG GAT GCT GCG AAG AAG GAT GAC GCT AAG AAA GAC GAT GCT AAA AAG  
 140

FIG. 6E

Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ala Arg Gln Ser Gly Val Pro Asp  
 AAA CTG CTG ATT TAC TGG GCA TCC GCT AGG GAA TCT GCG GTC CCT GAT  
 330  
 Arg Phe Thr Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Ser  
 CCG TTC ACA GCG AGT GGA TCT GCG ACA GAT TTC ACT CTC TCC ATC AGC  
 340  
 Ser Val Lys Thr Gln Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr  
 ACT GTG AAG ACT GAA GAC CTC GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG TAT TAT  
 350  
 AGC TAT 360  
 AGC TAT CCC CTC AGC TTC GGT GGT GCG ACC AAG CTC GTG CTG AAG CTA  
 370  
 Ser Val Lys Thr Gln Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr  
 ACT GTG AAG ACT GAA GAC CTC GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG TAT TAT  
 380  
 Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gln Ala Gly Thr Lys Leu Val Lys Leu  
 AGC TAT CCC CTC AGC TTC GGT GGT GCG ACC AAG CTC GTG CTG AAG CTA  
 390  
 EcoRI III  
 Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys Asp Ala Ala Lys Lys Asp Asp Ala Lys  
 AGC GCT GAT GAT GCT AAG AAG GAC GCG GCA AAA AAG GAC GCA AAA  
 400  
 Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Leu Gln Val Gln Leu Gln Ser Asp  
 AAG CAT GAT GCA AAA AAG GAT CTC GAG GTT CAG TTC CAG CAG TCT CAC  
 410  
 Ala Gln Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala  
 GCT GAG TTG GTG AAA CCT GCG GCT TCA GTG AAG ATT TCC TCG AAG GCT  
 420  
 430  
 440  
 450  
 460  
 470  
 480  
 490  
 500

FIG. 6C

Asp Leu Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Asp Ala Gln Leu Val Lys Pro  
 GAC CTC GAG GTT CAG TTG CAG CAG TCT GAC GCT GAG TTG GTG AAA CCT  
 150  
 Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr  
 GCG GCT TCA GTG AAG ATT TCC TCG AAG GCT TCT GCG TAC ACC TTC ACT  
 160  
 Asp His Ala Ile His Trp Val Lys Gln Asn Pro Gln Gln Gly Leu Gln  
 GAC CAT GCA ATT CAC TGG GTG AAA CAG AAC CCT GAA CAG GCG CTG GAA  
 170  
 Trp Ile Gly Tyr Phe Ser Pro Gly Asp Asp Phe Lys Tyr Asn Gln  
 TCG ATT GCA TAT TTT TCT CCC GGA AAT GAT GAT TTT AAA TAC AAT GAC  
 180  
 Arg Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Thr  
 ACG TTC AAG GCG AAG GCG ACA CTC ACT GCA GAC AAA TCC TCC AGC ACT  
 190  
 Trp Ile Gly Tyr Phe Ser Pro Gly Asp Asp Phe Lys Tyr Asn Gln  
 TCG ATT GCA TAT TTT TCT CCC GGA AAT GAT GAT TTT AAA TAC AAT GAC  
 200  
 Arg Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Thr  
 ACG TTC AAG GCG AAG GCG ACA CTC ACT GCA GAC AAA TCC TCC AGC ACT  
 210  
 Ala Tyr Val Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Gln Asp Ser Ala Val Tyr  
 GCG TAC GTG CAG CTC AIC AGC CTC ACA TCT GAG GAT TCT GCA CTG TAT  
 220  
 230  
 240

浄書(内容に変更なし)

FIGURE 7

CC49 VL-L-VH-L-VH-L-VLのDNA及びアミノ酸配列

5'-C	TCA	TGT	TTG	ACA	GCT	TAT	CAT	CGA	TGA	ATT	CCA	TCA	CTT	CCC	TCC	46	
Cis I 2008 I																	
GTT	CAT	TTG	TCC	CGG	GTG	GAA	ACG	AGG	TCA	TAT	CTT	CGT	TCC	GAA	AAA	94	
ACG	GTT	GCA	TTT	AAA	TCT	TAC	ATA	TAT	TAT	AAT	ACT	ATC	AAA	GAC	TAC	ATT	182
TGT	AAG	ATT	TGA	TGT	TTG	AGT	CGG	CTG	AAA	GAT	CGT	ACG	TAC	CAA	TTA	190	
TTG	TTT	CGT	GAT	TGT	TCA	AGC	CAT	AAC	CTT	GTA	GCG	ATA	GTC	GAA		238	
GTG	CTT	CAT	CTG	GTT	ACG	ATC	ATA	CAA	TTC	CAA	CGG	AGC	GAG	ACG		286	
PENPR2- TAT AAG TTT GCC TCC CTC TG																	
-22																	
Met	Lys	Tyr	Leu	Leu	Pro	Thr	Ala	Ala	Ala	Gly	Leu	Leu	Leu				
ATT	TTC	ATG	AAA	TAC	TAT	CTT	CTG	ACG	GCA	GCC	GCT	GGA	TTG	TTA	TTA	334	
Nco I VL																	
Leu	Ala	Ala	Gln	Pro	Ala	Met	Ala	Asp	Ile	Val	Met	Ser	Gln	Ser	Pro		
CTC	GCT	GCC	CAA	CCA	GCC	ATG	GCC	GAC	ATT	GTG	TAT	CAC	GAG	TCT	CCA	382	
10 20																	
Ser	Ser	Leu	Pro	Val	Gly	Gln	Lys	Val	Leu	Ser	Cys	Lys					
TCC	TCC	CTA	GCT	GTC	TCA	GTT	GCC	GAG	AGA	GTT	ACT	TTG	AGC	TGC	AAG	430-	

## FIG. 7B

[illegible]

FIG. 6F

[illegible]

## FIG. 6G

GAA TCC GTC AAA ACA TCA TCT TAC ATA AAG TCA CTT GGT GAT CAA GGT	2014
SQP1- TGT AGT ACA ATG TAT TTC AGT PENTSEQ2- G TAT TTC AGT GAA CCA CTA GTT	
CAT ATC ATT CTC CGG CAA TGG TGT GGG CTT TTT TTG TTT TCT ATC TTT	2062
AAA CAT CAT GTG AAG AAA AAC GGG AAA ATC GGT CTG CGG GAA AGG ACC	2110
GGG TTT TTG TCG AAA TCA TAG CGG AAT GGG TGC GAT TGT GAC AAA ATT	2158
BamH I CGG ATC C-3'	2165

FIG. 7C

380 Ser Leu Asn Met Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser  
 TCC CTG AAT ATG GGC TAC TGG GGT CAA GGA ACC TCA GTC ACC GTC TCC 1538  
 390  
 Ser Leu Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys Asp GCA Ala Lys Lys Asp Asp  
 TCA CTA ACC GCA GAT GAC GCA AAG AAA GAC GCA GCT AAA AAA GAC GAT 1582  
 400  
 Ala Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Leu Asp Ile Val Met Ser Gln  
 GGC AAA AAG GAT GAC GGC AAG AAA GAT GTT GAC ATT GTG ATG TCA CAG 1630  
 410  
 Ser Pro Ser Ser Leu Pro Val Ser Val Gly Gln Lys Val Thr Leu Ser  
 TCT CCA TCC TCC CTA CTT GTG TCA GTT GGC GAG AAG GTT ACT TTG AGC 1678  
 420  
 Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Gly Asn Gln Lys Asp Tyr  
 TGC AAG TCC AGT CAG AGC CTT TTA TAT AGT GGT AAT CAA AAG AAC TAC 1726  
 430  
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile  
 TTG GCC TCG TAC CAG CAG CAA CCA GCG CAG TCT CTT AAA CTG CTG ATT 1778  
 440  
 Tyr Trp Ala Ser Ala Arg Cys Oly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly  
 TAC TGG GCA TCC GCT AGG GAA TCT GCG GTC CTT GAT CCG TTC ACA GGC 1822

FIG. 7E

490 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Ser Ser Val Lys Thr  
 AGT GGA TCT GGC ACA GAT TTC ACT CTC TCC ATC AGC AGT GTC AAG ACT 1870  
 500  
 Gln Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu  
 GAA CAC CTG GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG CAG TAT TAT AGC TAT CCG CTC 1918  
 510  
 Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Val Lys \*\*\* Nhe I  
 ACC TTC GGT GCT GGG ACC AAG CTG GTG CTT AAG TAA AAA GCT AGC GAT 1966  
 520  
 GAA TCC GTC AAA ACA TCA TCT TAC ATA AAG TCA CTT GGT GAT CAA GCT 2018  
 530  
 CAT ATC ATT GTC CCG CAA TGG TGT GCG CTT TTT TTG TTT TCT ATC TTT 2062  
 540  
 AAA CAT CAT GTG AAG AAA AAC GCG AAA ATC GGT CTG CCG AAA AGG ACC 2110  
 550  
 GCG TTT TTG TCG AAA TCA TAG CCG AAT GCG TTG GAT TGT GAC AAA ATT 2158  
 560  
 BamH I  
 CCG ATC C-3' 2165

FIG. 7D

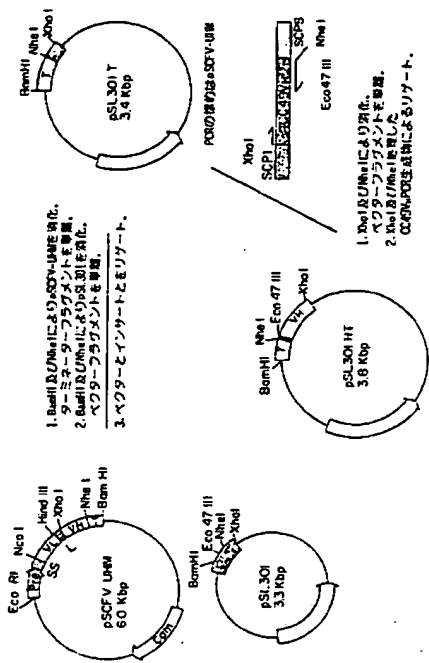
250 Val Thr Val Ser Ser Leu Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys Asp Ala Ala  
 GTC ACC GTC TCC TCA CTA AGC GCA GAT GAC GCA AAG AAA GAC GCA GCT 1150  
 260  
 Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Leu Gln Val  
 AAA AAA GAC GAT GGC AAA AAG GAT GAC GGC AAG AAA GAT CTT GAG GTT 1198  
 270  
 Gln Leu Gln Gln Ser Asp Ala Gln Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val  
 CAG TTG CAG CAG TCT GAT GAT GAT TTG GTC AAA CCG GGT TCA GTG 1286  
 280  
 Lys Ile Ser Cys \*\*\* Nhe I  
 AAG ATT TCG TCG AAG GGT TCT GCG TAC AGC TTC ACT GAC CAT GCA ATT 1326  
 290  
 His Trp Val Lys Gln Asn Pro Gln Gln Gln Leu Gln Trp Ile Gly Tyr  
 CAC TCG GTG AAA CAG AAG CCA CCG GGT GCA GGC CCG GAT GAT GAT 1382  
 300  
 Phe Ser Pro Gly Asn Asp Asp Phe Lys Tyr Asn Gly Arg Phe Lys Gly  
 TTT TCT CCG GCA AAT GAT GAT TTT AAA TAC AAT GAG AAG TTC AAG GGC 1390  
 310  
 Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Thr Ala Tyr Val Gln  
 AAG GCC ACA CTG ACT GCA GAC AAA TCC TCC AGC ACT GCG TAC GTG CAG 1438  
 320  
 Leu Asn Ser Leu Thr Ser Gln Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Thr Arg  
 CTC AAC AGC CTC AGA TCT GAG GAT TCT GCA GTG TAT TTC TGT ACA AGA 1486

FIG. 7F

490 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Ser Ser Val Lys Thr  
 AGT GGA TCT GGC ACA GAT TTC ACT CTC TCC ATC AGC AGT GTC AAG ACT 1870  
 500  
 Gln Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu  
 GAA CAC CTG GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG CAG TAT TAT AGC TAT CCG CTC 1918  
 510  
 Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Val Lys \*\*\* Nhe I  
 ACC TTC GGT GCT GGG ACC AAG CTG GTG CTT AAG TAA AAA GCT AGC GAT 1966  
 520  
 GAA TCC GTC AAA ACA TCA TCT TAC ATA AAG TCA CTT GGT GAT CAA GCT 2018  
 530  
 CAT ATC ATT GTC CCG CAA TGG TGT GCG CTT TTT TTG TTT TCT ATC TTT 2062  
 540  
 AAA CAT CAT GTG AAG AAA AAC GCG AAA ATC GGT CTG CCG AAA AGG ACC 2110  
 550  
 GCG TTT TTG TCG AAA TCA TAG CCG AAT GCG TTG GAT TGT GAC AAA ATT 2158  
 560  
 BamH I  
 CCG ATC C-3' 2165

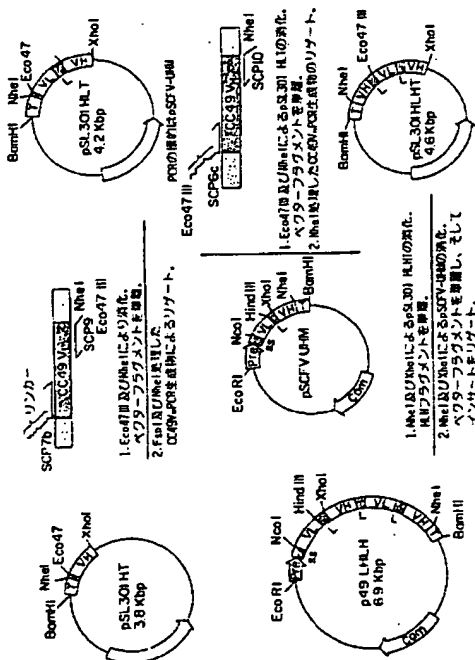
特価(内容に変更なし)

FIGURE 8



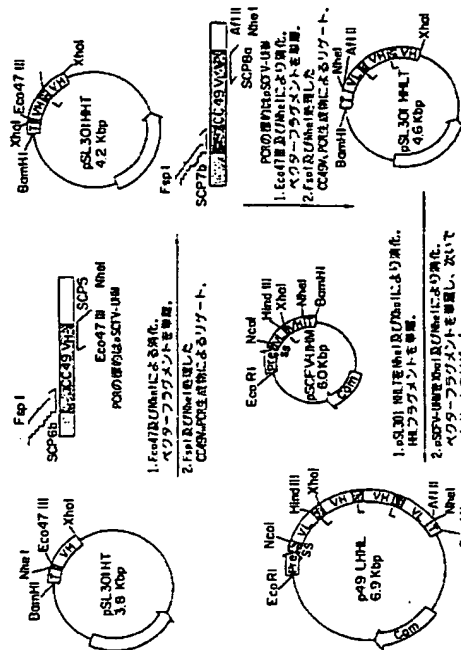
淨書(内容に変更なし)

FIGURE 10



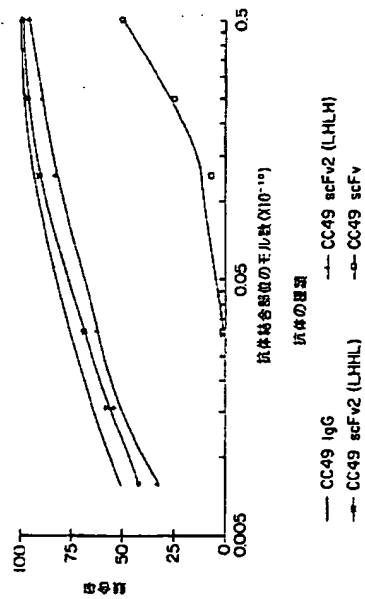
抄書(内容に変更なし)

FIGURE 9



特約(内容に変更なし)

FIGURE 17

CC49 1cG, SCFV2 と SCFVの融合アッセイ  
融合因子: ビオチニル化CC49 1cG

平成6年 9 月 1 日

特許庁長官 高 島 重 昭

1. 事件の表示  
PCT/US93/12039
2. 発明の名称  
多価の一本鎖状体
3. 補正をする者  
事件との関係 特許出願人
- 名称 ザ ダウ ケミカル カンパニー

4. 代理人

住所 〒105 東京都港区虎ノ門一丁目8番10号 静光虎ノ門ビル

青和特許法律事務所 電話 3504-0721

氏名 弁理士(7751)石田 敬

5. 修正命令の日付  
自発修正

## 6 補正の対象

- (1) 明細書、請求の範囲及び要約書の翻訳文
- (2) 図面の翻訳文
- (3) 委任状

## 7. 補正の内容

- (1) 明細書、請求の範囲及び要約書の翻訳文の浄書（内容に変更なし）
- (2) 図面の翻訳文の浄書（内容に変更なし）
- (3) 別紙の通り



國際調查報告

[illegible]

# 國際調查報告

Continuation - DOCUMENTS CONTINUED TO BE RELEVANT		
Category	Content of citations, text citations, where appropriate, of the relevant passages	Section or page No.
Y	<p>BIOCHEMISTRY vol. 30, no. 42, 22 October 1991, EASTON, PA US pages 10137 - 10125 R.W.PANTOLIANO ET AL. 'Conformational stability, folding and ligand-binding affinity of single-chain Fc immunoglobulin fragments expressed in Escherichia coli' cited in the application see page 10120, column 1, paragraph 2</p>	2,4
X	<p>EP.A.0 506 124 (TANOX BIOSYSTEMS, INC.) 30 September 1992 see example 4</p>	2,6
P,X	<p>WO.A.93 11161 (ENZIG, INC.) 10 June 1993 see figure 15A</p>	1,9-6

國際調查報告

Patents disseminated related to weapons registers		Publication date	Patents Registry (country/region)	Publication date
MO-A-9119733	26-12-91	AU-A- EP-A- GB-A- JP-T-	7883191 0488652 2250993 8502039	07-01-92 27-05-92 24-06-92 18-04-93
EP-A-0506124	30-09-92	AU-B- AU-B- JP-A-	6408643 1290292 8117184	02-09-93 15-10-92 14-05-93
MO-A-9311163	10-06-93	AU-A-	3178993	28-05-93



フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>4</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I
C 0 7 K 16/46		8318 -4H	
C 1 2 N 15/09	Z N A		
//(C 1 2 P 21/08			
C 1 2 R 1:19)			







して多体からより迅速に誘導される。

誘導及び／又は治療用油のため、この多価の一価抗体は1又は複数の抗体フラグメントが併時的にに対して効果的であるように、及び／又は複数の抗体フラグメントが部分的もしくは治療因子に対して効果的であるように物結せられる。

本発明は更に、癌の処置の増進及び／又は治療において有用な特性に好適な薬理活性をも考慮しており、ここでこの増進効果はしばしば細胞の癌基上で発現される。診断及び／又は治療用油のため、この多価の一価抗体は適当なイメージ又は治療時に当業界に公知の方法によって融合せられる。本発明の薬理活性効果は当業界に公知の方法、例えば薬物の結合、癌基又は腫瘍形成工程によって誘致される。

本発明を、その単なる例示を含む下記の真価例の考慮により更に明かかにする。

#### 例 5

BC17 5-ブロードモークコロ-3-インドノルホスフェート

BB 塩基対

Bis-Trisアロパン (1, 3-ビス(トリス(ヒドロキシメチル)アミノメチル)フロパン)

BGA 牛血清アルブミン

CCR 細胞性決定試験

ELISA 酵素結合免疫吸着アッセイ

Fv2 お共有一本鎖ダイマー

IFP 等電点電気泳動

Ibp 牛血清白

LD Loria Bertan; 環通

Mab モノクローナル抗体

MES 2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸

MR 分子電

NDT ニトロブルーネオタリウムクロリド

オリゴ オリゴヌクレオチド

FAG ポリアクリルアミドゲル

FAGE ポリアクリルアミドゲル電気泳動

FES リン酸緩衝液

Fv2 ポリマーゼ連鎖反応

gSGF2 GSF2をコードする DNA配列を含むプラスミド

GIES ラジオイムノグノド外科

ET7 ラジオイムノ治療

scFv 一本鎖バイクロブリンフラグメントモノマー

scFvs 共有結合した一本鎖バイクロブリンフラグメントダイマー

SPS ドデシル硫酸ナトリウム

TBS トリス緩衝液

トリス (トリス(ヒドロキシメチル)アミノメチル)

TTBS ツーオン20X溶液

V<sub>α</sub> イムノグロブリン重鎖可変ドメイン

V<sub>β</sub> イムノグロブリン軽鎖可変ドメイン

#### 実施例

CC49: ヒト腫瘍関連タンパク質72(TAG-72)に特異的なネズミモノクローナル抗体; ATCC No. D8456として寄託。

CC49Fab: 重鎖のN-末端領域に結合している完全抗体より成るCC49の抗腫瘍性抗体。

CC49scFv: ペプチドリinkerにより連結されているCC49抗体の二本の可変ドメインより成る一本鎖抗体フラグメント。

CC49v2: ダイマーを構成するように共有結合している2つのCC49scFv。7vの数字の数字は、表示の分子のモノマーサブユニットの数を意味する。例えば、CC49v6は六量体の多量体を意味する。

CC49scFv2: 3つのリinkerにより連結されている、2本のCC49v1ドメインと2本のV<sub>α</sub>ドメインとより成る共有結合一本鎖抗体フラグメント。V<sub>α</sub>(L1)とV<sub>α</sub>(D)ドメインとを連結し合わせるのに6つの可能な順序の組合せがある: LBLR, LRRL, LLRR, LLRL, RLRL及びRLLR。

#### プラスミド

gPCV-UVB: 22のアミノ酸リinkerにより連結されている、CC49の可変領域とCC49抗体重鎖とより成るscFvについてのコード配列を含むプラスミド。

gCMV-UVB-2 (CC49scFv2): LBLRL中成動のそれぞれを連結するためのコード配列を含むプラスミド。

#### 実施例

##### 一般試験

分子クローニングのための手順は、その順序内容を引用することによって本明細書に組み入れ、Sambrookら、Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Press, New York 2版(1989)及び Ausubelら、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, New York (1992)に記載の手順である。

ここで用いた水は全て超イオン蒸留水とした。

##### オリゴヌクレオチドの合成及び塩基

オリゴヌクレオチド(オリゴ)は全て、塩基の5'-シアノメチルホスホニミジット酸(合成カラム)を用い、Applied Biosystems (Foster City, CA) 由来のModel 381 DNA合成装置のいずれかで合成した。その生成物上の所産物は、濃硫酸アンモニウムの中で55℃で6-15時間加熱することにより除去した。濃硫酸アンモニウムはエペレーションを介して除去し、そしてその粗産物を30-40μlの蒸留水の中に再溶解させた。ポリアクリルアミド-尿素ゲルでの電気泳動の後、オリゴを塩酸(4N)を用いて可視化させた。FABバンドをゲルから切り出し、そして1μlの100mMのトリス-HCl, pH 7.4, 500mMのNaCl, 5mMのDTAの中で低圧で2時間かけて凍結させた。最終精製は、BMSをSep-Pac(新薬)C-18カラム(Wilmington, Bedford, MA)に適用し、そして結合したオリゴを60%のメタノールで洗脱させることによって行った。その塩濃の洗脱を約30%に下げ、そしてDNA濃度を200nm (OD<sub>260</sub>)での光学密度を測定することにより決定した。

##### 細胞培養条件

細胞培養条件は全て、Beitlands Research Laboratories (Gaithersburg, MD)。

New England Biolabs, Inc. (Goverly, MA)又はBoehringer Mannheim (BN, Ind. (Germany))の酵素及び試薬を用い、その製造者の推奨する手順に従って実施した。塩基させた試薬物をポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)により分離させた。そのゲルをニチウムブロムリドで染色し、そのDNAバンドを短波紫外により誘引させた。次いでそのDNAバンドを切り出した。そのゲルスライスを、5mMのトリス、25mMの酢酸、1mMのDTA, pH 8.0を含む透析チューブ(Calco Cartridge Corp., Chicago)の中に入れた。そしてMax Sorbmer電気泳動装置(Bio-Rad Scientific Instruments, CA)を用いて凍結させた。ランブル管をSund Vac洗脱器(Savant Instruments, Inc., NY)で下げた。DNAをエタノールに沈ませ、そして蒸留水の中で再溶解させた。

##### 酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)

Johnsonら、Can. Res., 46, 850-857 (1986)に従って経験的に最適化して調整したTAG-72抗原を、ポリビニルクロリド36穴マイクロタイフプレート(Costar Laboratories, Inc., High Wycombe, UK)のウェルの上に一夜凍結させることで凍結させた。そのプレートをPBS中の1%のBSAで30℃で1時間ブロックし、次いで200μlのPBS、0.05%のツブーン30で30℃で1時間洗った。25μlの抗原試液及び25μlのビオチニル化CC49(1/20,000倍希釈の1mg/mlの溶液)をウェルに加え、そしてそのプレートを30℃で30分インキュベートした。プレートに結合したTAG-72、ビオチニル化CC49、ストレプトアビジンアルカリホスファターゼの相対量、及び発色時間は、余剰な抗体又はビオチニル化CC49がないように、しかもscFvによる結合を誘起するに十分なシグナルが得られるように実験的に決定した。陽性コントロールは5μg/mlのCC49及び10μg/mlのCC49Fabとした。陰性コントロールはPBS中の1%のBSA及び／又はL1とした。未結合のタンパク質を洗い流した。アルカリホスファターゼの結合された1:1000の花崗岩のストレプトアビジン50μl(Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, AL)を加え、そしてそのプレートを30℃で30分インキュベートした。そのプレートを更に3回洗った。50μlのパラニトロフェニルホスフェート溶液(Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, MD)を加え、そして発色反応を最低20分待った。scFv2結合の相対量をマイクロプレートリーダー(Mo-



100mLのパッケージがおよそ1リットルです。1リットルは通常の家庭用のインサート（OXA）を用いるリザーション機を、Stratagene社（米国、カリフォルニア州、ラ・ホーヤ市）の1414リザーブセットを用い、数分間の指示にしたがって行った。リザーション反応液（全容積0.1mL）は最初18℃でインキュベートし、次いで4℃まで待たせに冷却した。

### 形質新報

形変換後、 $100\mu\text{M}$ のStratagene社製の大量DNA (pG.1) AG1コンピュタント植物(米国、カリフォルニア州、ラ・ホーヤ所在のStratagene社)を用い、メーカーの指示によって行った。上記工程の反応後抽出液のpHを5.5に調整し、使用した。右記型変換ステップの後、細胞は、造毛剤を含む細胞培養液(10 $\mu\text{M}$ のbFGF)中で37°Cで1時間再生させ、続いて、pSCFV(DNA p49LNL)もしくはp49LNLに用いる20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のポリヌクレオチド含有(45 $\mu\text{M}$ )のポリヌクレオチドにプレインシ、またはプラスミドpSL391を含有するクローンもしくはpSL391由来の遺伝子の構築に用いる。100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ アンピシリン(Amp<sup>r</sup>)の細胞を天プレート(DLR-AMP<sup>r</sup>細胞)上にプレートした。

## 六肥田クローンのスクリーニング

組紐プラスミドは、Promega社（米国、ウィスコンシン州、マディソン所在）の Magicミニプレッププラスミド製造キットを用いて、梅田王（selection pressure）を維持するための適切な濃度を含有するLBプロセス系物から分離した。このキットはメーカーの互換性説明書にしたがって使用した。

ブラスミドで検索

pH10.0および pH9.5と命名された2種のプラスミドを、多数の一本鎖抗体を製造するために構築した。pH10組を含有する遺伝子構築は、V<sub>H</sub>-L<sub>V1</sub>-L<sub>V2</sub>-L<sub>V3</sub>で成すことができるリペプチドを生成した。ここでV<sub>H</sub>とL<sub>V1</sub>は12458抗体のC<sub>H</sub>ドメインと重鎖の555ドメインであり、およびリンカー（L）は、下記 SEQ ID NO: 5の配列を有する塩基のアミノ酸のコンプレックスである。

Leu-Ser-Ala-Asp-Asp-Ala-Lys-Lys-Asp-Ala-Ala-Lys-Lys-Asp-Asp-Ala-Lys-  
Lys-Asp-Asp-Ala-Lys-Lys-Asn-Leu

5.9LEBLを含有する宿主細胞は、 $V_1$ 、 $-L-V_2$ 、 $-L-V_3$ 、 $-L-V_4$ で表すことができる

示した。陽性グループであり、かつBsaBI および XbaI による消化比率の 20% 程度の塩基切断片 (図 6) に対し、 $95^{\circ}\text{C}$ ・2.55 の塩基対 (bp) を含有するクローン (pSL3012) と重合し、改めて  $64^{\circ}\text{C}$  以下に存在する XbaI による DNA 配列を含有する pSL3012-RT を増殖するものに選択した。pSL3012-RT による PCR アmplification を pSL3012-RT に所定の塩基は、その XbaI と XbaI の位置の間でオリゴマー領域中に存在する pSL3012-RT 制限エンドアタックアッセ部位を除くためであった。このことは、BsaBI 部位が、増殖体中に高濃度で存在するものにユニークである必要があることを示し、その領域を統一し増殖するため設計された。各 Y 細胞が Ec447II XbaI 部位に付加されると、Ec447II は各場合に破壊されて、ユニーク断片に入っている Ec447II 部位を破壊した。

V。配列は、PCR増幅のprimerとして pSFF-JEMを用い、オリゴの5' SCPIと3' オリゴSGPIによって FCIで作製した。SCPIに対するDNA配列(SEQ ID NO: 10)とSGPIに対する DNA配列(SEQ ID NO: 11)は次のとおりである。

SDS1 : 5' -TAA CTC CAG GTT CAG TTC CAG CAG-3'

SOP5: 5' -TAA GGT AGC ACCA AGC GGT TAG TGA GGA GAC GGT GAC TGA GGT-3'

下線を付けた部分はエンドヌクレアーゼ制限部位を示す。

増加された  $V_{\text{K}}$  DMA を、4 N の 3% 塩酸溶液、エタノールによる抽出および 20 mL 水への溶解によって増量した。その  $V_{\text{K}}$  抽出物を  $\text{Ib}[\text{I}]$  と  $\text{Ib}[\text{II}]$  の両成分で消化し、同じ塩酸酵素で消化された炭で得られた p53G17 ペクターに溶するインペーンとして用いた。塩基のグーテンホッフ反応を行い、約一割分 (4  $\mu\text{L}$ ) を増いてコンピュート人工筋 10 秒を形成させた。筋に保持された増量を、 $\text{Ib}[\text{AMP}]$  10 滴をフットにプレートした。[4.7% インサート] を増育していることを示す顕微鏡クロマトに  $\text{N}_2$  および  $\text{Ib}[\text{I}]$  消化スクリーンから抽出した。

United States Biochemical (USB) 社 (米国、オハイオ州クリーブランド所在) の Sequence Kit、および配列決定用プライマー pSL301SE (pSL301 ベクター中、 $\text{Xba}$ I 和  $\text{Hha}$ I 間で 57bp) 上でオリエントした *gfp* の配列決定プライマーと CPGASIV を用いて、*gfp* の配列決定を行って、(45%) の配列を導出した。pSL301 HT 中に近い 100% 配列を導くシーケンスを明らかにした。このプラスミドは

ポリペプチドを産生した。こゝでV<sub>1</sub>とV<sub>2</sub>はO16反体の酵素と魚卵の可変部位であり、およびは上記アミノ酸配列を有するペプチドリンカーである。

CCAGV, L-V<sub>1</sub>-L-V<sub>2</sub>-L-V<sub>3</sub> (p49.31H) のヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 6) とアミノ酸配列(SEQ ID NO: 7)を図6に示す。(L49V<sub>1</sub>-L-V<sub>2</sub>-L-V<sub>3</sub> (p50.00H) のヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 8) およびアミノ酸配列(SEQ ID NO: 9)を図7に示す。

ESL301HIT09B

PSL001の構造面を第8に示す。バシリス・リネファルミス(Basilus liechtenforffis)のペニシリゾープ(PSMP) ターミナTORの配列を、The1およびBz1間で45%の類似性をもつことになった。pSCFV130に在るペニシリゾープから抽出し、電気泳動を行った後、4.5%ポリアクリルアミドゲルから切取り、電気泳動させ、エタノールで洗脱させ、次に、同様に抽出されたペニシリゾープ:PSL331(米国、カリフォルニア州、サンディエゴ所在のInvitrogen社)との可及的類似性を見た。pSCFV130の製造手帳は、1992年11月21日付けの米特許第5,077,905、605号に記載されている。なおこの出願の開示事項は本発明に適用するものである。

段、pSCFV130は、pSP6プロモーターの3'テラオロ配列、リナー(NcoI制限部位):G457、領域:B1nnd制限部位:256の1/2重の順子で構成し、図4のNcoI制限部位:G497、領域:NheI制限部位:pccfタ・ミネーター;およびPstRI制限部位を含む有している(図4参照)。このpSP6プロモーターとpccfタ・ミネーターは、Bsp676、B1nnd、Ccm6、256番、12211-12155番、1985年に記載されている。

上記のリゲーション反応の一部(3 μL)を、LB+AMP(100 μg/mL)プレート上に  
プレートし、以後、夜培養されたコンドバメント大腸菌AG144菌を形態観察するの  
に用いた。penEターミネーター、インサートを含むペテンシヤルローンを  
・Pharmacia社(米国、メーランド州、ガイサーズビル市)の T1 Taq polymerase  
・219 DNAポリメラーゼと、Bulweria, Nucleic Acid Research, 17巻、452  
頁、1989年に記載されているイタリヤおよびフランスの研究者とともに用いてス  
クリーニングした。ゲノムは、penE-3hr1-3hr31ターミネーター・ペテンシヤ  
ルローンであるが、Quickprepキットによって提供された指示によって迅速にス

pSL301-7B17およびpSL301-11B17の両方を構成するときの出発点で使った。使用した配列決定年のオリゴをここに示す。

9SL3015EQR(SEQ ID NO: 12) および CE497 (SEQ ID NO: 13) のオリゴヌクレオチド配列は次のとおりである。

5'-TCC TCC GAT TAC GGA AGC TTA 3'  
 3'-GAT GAT TTT AAA TAC AAT GAG 3'

男推例1 2421.HH1. の構造

pS-DHIT (5 μg) を出発物質として、これと RecA7 阻害体および H<sub>2</sub>O で消化し、大きい方のペグターフラグメントを精製した。CC49b 挿入フラグメントは、5' オリゴとして SCPGCC を用いかつ 3' オリゴとして SCF5 を使い、PCR によって増殖した。SCF6b のヌクレオチド配列 (352-1357:14) は下記のとおりである。

SEQUENCE: 5' -TAA TGC GCA GAT GAC CGA AAG AAA GAC CGA CCG AAA AAA GAC GAT  
 GGC AAA AAG CAT GAC GGC AAG AAA GAT GTT GAG GTT CAG TTG CAG GAC  
 TCT-G'

またオリゴ SCFEBはリンカーのコーディング領域の一部(SEQ ID NO: 14)のbp 6 ~ 76)を含有している。pSCFV (E)中のcc49733的でアニールするよう設計されたオリゴの部分、SEQ ID NO: 14中のbp 77 ~ 900末のものである。

下脚をつけた配列は `asp1` 部室に相当する。得られた PCF インターを複製し、`asp1` と `hbe1` で置き換えて `p5339187_Sec47Ile` となる `hbe1` ペクターとのリダーシオン反応に用いた (図 1)。コンピュートational ABE 構築者、このリダーシオン反応物 (1) により重組産物を生ずるために、`hbe1`—`hbe1` のプレートをプレートした。`p5339187Ile` 生成物を示す正しいサイズの `hbe1`—`hbe1` インサートを有する各条のクローンの配列をオリゴDQを用いて決定し、正しい空間 (1) のヌクレオチド [124—1543] を有する塩対子とその後の領域に用いるのに選んだ。`SGT1` のヌクレオチド配列 (SGT1 [11: 15]) は下記のとおりである。

最終のリンカー-V、サブユニット (bp1344~1666, 図7) は、5' オリゴの S  
CP7b と 3' オリゴの SGP1a を用いてかつ PCR の検出として pSCEFT 100を用いて同定

した。SCP76のヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 19) は下記のとおりである。

SCP76: 5' -TAA TGC GCA GGT GAC GCA AAG AAA GAC GCA GAT AAA AAG GAT  
GAC AAA AAG GAT GAC GGC AAG AAA GAT CTT GAT ATT GTC ATG TCA GAG TTT  
GC

下線をつけたヌクレオチドは PspI 部位である。SCP76のヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 17) は下記のとおりである。

SCP76: 5' -TAA GCT AGT TTT TTA CTT AGC GAC  
GAG CTT GGT CCG T

下線をつけた最初の「塩」は XbaI 部位に相当し、もう一つの塩は AflII 部位に相当する。SCP76のヌクレオチド81-76はリンカーをコードし(図7のヌクレオチド1344-1812)、一方、Aにアミノ化するヌクレオチド77-93は図7の1612-1625に相当する。プライマー SCP8a12、その3'末端の塩かいテール、NheI 制限部位、終止コドン、AflII 制限部位およびV<sub>H</sub> の塩基の21個の塩基を含むしている。PspI と XbaI による消化の後、この得られた(29bp)のインサートを複製して精製pSL300HTベクターの NheI と Eco47III の部位に連結し、候補的なクローンを NheI と IspI でスクリーニングし、正しい大きさのインサートが確認されたpSL300HT(-)とSCP76で配列が決定されて、pSL300HT(-)に挿入した配列が確認された。そのヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 20) は下記のとおりである。

49LFC2(-): 5' -CTG CTG GTA CCA GCG CAA G-3'

プラスミドpSL300HTを NheI および XbaI で消化し、複製し、得られた176bp V<sub>H</sub> リンカー-V<sub>H</sub> リンカー-V<sub>H</sub> セグメントを pSCFV LTRに連結して p49LFC2を製造した。なおこの pSCFV LTRは同じ制限酵素で切断された大きい方のフラグメントを複製したものである。そのリザーブションで生成物(4μl 部分)を用いてコンピナント大腸菌AL1細胞(Stratagene社)を形質転換し、LB/CA 2X(寒天プレート)にプレートした。正しい制限酵素型を有するプラスミドを含む単クローンを、p49LFC2を含むために選択した。p49LFC2は、CC49多価一本鎖抗体 scFv2: V<sub>H</sub>-L<sub>1</sub>V<sub>H</sub>-L<sub>1</sub>Fc<sub>1</sub>-L<sub>1</sub>Fc<sub>1</sub> またはCC49scFv2 (L<sub>1</sub>H<sub>1</sub>)のpSPプロモーターとヌクレオチド配列を含むしている。

りは次のステップで修正され、オリゴSCP6C (SEQ ID NO: 21) の末端に5塩基の欠失を補正することによってpSL300HTに製造した。

SCP6C: 5' -TATCCGCTGATGATGCTAAGAGAGAGCCGCAAAATA  
GCGACGACGACAAAGATGATGATGACAAAGAGATCTCG  
AGGTTAGTTGACGAGTCTGAC-3'

SCP6C中の下線をつけた配列はEco47III部位に相当する。SCP6Cにおいて、SCP6Cは5'オリゴとして用いられ一方SCP16は3'オリゴとして用いられ、リンカー-CC49(セグメント)が生成する。SCP16のヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 22) は下記のとおりである。

SCP16: 5' -TTC TGC TAG CTT TTT ATG AGG AAG CAG TCA  
CTG AGG TT T

SCP16中の下線をつけた配列は図6のヌクレオチド1938-1953に見られる XbaI 部位に相当する。この場合、PCRインサートは NheI だけで消化され、XbaI で消化される。ベクター(pSL300HT)は Eco47III部位(先に形成されている)および NheI 部位で消化され、XbaI で消化された。そのインサートとベクターは連結され、その一部分(3μl)を供ってコンピナント E. coli BL21細胞を形質転換した。この形質転換細胞をLB-AMP100プレート上にプレートし、XbaI で消化したクローンを NheI と XbaI でスクリーニングした。正しい大きさの DNAを有する単クローンを得た。これらのクローンのうちの2個は、オリゴ49LFC2(-)およびSCP16を添えて配列を決定した。そのヌクレオチド配列(49LFC2(-)の194-1953)は下記のとおりである。

49LFC2(-): 5' -GAG CAG TAT TAG AGC TAT-3'

正しい配列を有する一つのクローンが得られ、そして図6のヌクレオチド1533-1553からの配列が確認され、正しいpSL300HTクローンを示した。

大腸菌中で発現させるのに用いる最終的なプラスミド p49LFC2を製造するために、pSL300HT(5μg)を NheI と IspI で消化し、次いで V<sub>H</sub>-L<sub>1</sub>V<sub>H</sub>-L<sub>1</sub>Fc<sub>1</sub>配列を含む小さい方のインサートを挿入した。この断片を、pSCFV LTR(5μg)を IspI と NheI で消化して得た大きい方のベクターフラグメントの断片と連結した。上記連結混合物の一部(4μl)を用いてコンピナント大腸菌AL1

#### 実施例2: p49LFC2の構築

p49LFC2の構築を図10a図式的に示す。リンカー-V<sub>H</sub>のサブユニットを3'オリゴの SCP76と3'オリゴのSCP76で製造した。

SCP76: 5' -TAA AGC TAC GAC CAA CCG CTT AGT TTC  
AGC AGC AGC TAC GTC CCA G-3'

SCP76オリゴ(ヌクレオチド81-76)は図6のリンカーをコードし(ヌクレオチド1124-1192に相当する)および図6のV<sub>H</sub>のヌクレオチド1193-1215に相当する。PCRに対する pSCFV LTR断片(ヌクレオチド77-93)にアミノ化した。

SCP76、NheI 部位(第一の下線をつけたヌクレオチド)と Eco47III部位(第二の下線をつけたヌクレオチド)を有し、これらの部位は次のV<sub>H</sub>領域を有するためpSL300HTを作るのに必要な制限部位である。SCP76のヌクレオチド18-23は図6のヌクレオチド1533-1537(リンカーの最初の2個のアミノ酸をコードしている)に相当し、一方ヌクレオチド24-46は、PCRにおけるSCP6C (SEQ ID NO: 19)のアミノ酸配列である図9に示すヌクレオチド1508-1531に相当する。プラスミドpSL300HTを Eco47III と NheI で消化し、そしてその大きい方のベクターフラグメントを複製して、予め PspI と XbaI で処理された複製された、PCRからのリンカー-CC49V<sub>H</sub> DNA インサートと連結させる。その連結混合物(3μl)を用いて大腸菌AL1コンピナント細胞を形質転換し、次いで正しい NheI - NheI の大きい方のフラグメントを有する一つのコンピナント配列をオリゴ PEG7502を用いて決定した。そのヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 23) は下記のとおりである。

5' TTC ATC ACC AAG TGA CTT TAC G-3'

配列決定の結果は、得られたpSL300HTクローン中に PCRの誤まりと欠失があるということを示した。図8にみられるヌクレオチド1533-1537に相当する5塩基の欠失がみとめられ、そしてTであるべきはずのヌクレオチド1531は TAA配列のテールから確認したところ実際にはGであった。得られた配列は、

5' -GAGGCGCTT ...であった。

ここで下線をつけた配列は図10aに Eco47III部位を形成した。図6のAGGCTTの配列はヌクレオチド1530、1531、1532、1533、1539および1543に相当する。このオリ

細胞を形質転換した。得られた形質転換混合物をLB-CA2X0 プレート上にプレートし、次いで p49LFC2に対する代差的なクローンを、正しい制限酵素部位(図10参照)および TAC TGC TGC に対する生物活性に基づいて選択した。

#### 実施例3: CC49のL<sub>1</sub>H<sub>1</sub>とL<sub>1</sub>H<sub>1</sub>の共有結合した二重鎖の構築

CC49の共有結合した一本鎖二重鎖(scFv2)の構築を行うために、大腸菌のベリプラスミド産物の成分を、p49LFC2と p49LFC2の成分の 1:1の一般無菌物から調製した。長時すると、培養物を 250ml づつの4部分に分割し、Seriva 1650ロータで10分間 5000rpmで遠心分離した。ペレット化した細胞を洗浄し、30mM NaClを含む10mM トリス-HCl pH 7.5からなる 100ml中に再懸濁させた。細胞を再びペレット化し、合計 100mlの50mM トリス-HCl pH 7.5で洗浄し、そして一つのチューブにプールした。このチューブに、40mMのスクロースを含む30mM トリス-HCl pH 7.5(100ml)および10mM EDTA pH 7.5(2.0ml)を加えた。得られた混合物を、時々振盪しながら、室温に10分間保持した。高活性細胞 (hyperactive cell)を有するようにしてペレット化した。次のステップでチェックを要して、該ペレットを20mlの水浴 0.5mM NaCl中に速やかに懸濁させ、次いで時々振盪しながら水浴に10分間保持した。その細胞を有するようにしてペレット化した。大腸菌の細胞抽出液の成分を含む上清を、0.2μmの Nalge社(米国、ニューメキシコ州、ロチェスター所在)の透過膜で処理することによってさらに清澄にし、次いでAmicon社(米国、マサチューセッツ州、ダンバース所在)のCentrifuge 30およびCentrifuge 30で 1.0mlより小さい容積まで濃縮した。

p49LFC2または p49LFC2のクローン由来の産物抽出液のシェケット (shot kete)を、Pharmacia社(米国、ニュージャージー州、ピスカタウニイ所在)のSuperdex 75 HX 12/30 HPLCカラム(予めP3で平衡化させたもの)に注入した。結合 ELISAで測定する場合、細胞の生成物は 0.5ml/分の速度で2-24分間洗脱させた。洗脱成分をプールし、次に述べたようにして濃縮し、次に、システム500 Microdialyzer Unit(Pierce Chemical社)を用い、緩衝液を3-4回交換しながら8000MWカットオフ膜を使用して、20mM トリス-HCl pH 7.6に充てて一度透析を行った。その試料を Pharmacia社のHPLC 3 HX 5/5 アニオン交換HPLCカラムに注射した。緩衝液Aとして20mM トリス-HCl pH 7.6を用い、流動相Bとし





Asn Glu Arg Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser  
Ser Ser Thr Ala Tyr Val Glu Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp  
Ser Ala Val Tyr Phe Cys Thr Arg Ser Leu Asn Met Ala Tyr Trp  
Gly Glu Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

と実質的に同じアミノ酸配列を示している、請求項1記載の多量の一単位体。

3. 前記第一と第二のペプチドリンカーが実質的に同じアミノ酸配列を示す、請求項1記載の多量の一単位体。

4. 多量の一単位体をコードする DNA配列であって、この多量の一単位体  
が7本以上の一本鎖状体フラグメントを含んで成り、各フラグメントが互いに列  
す本鎖和基を有しており、ここでそれらのフラグメントは第一のペプチドリンカ  
ーを介して共有結合されて成り、そして各フラグメントは：

(a) 断片可変ドメインを含んで成る第一ポリペプチド；

(b) 断片可変ドメインを含んで成る第二ポリペプチド；及び

(c) この第一と第二のポリペプチドを親和的な結合成分へと連結せしめる

第二のペプチドリンカー；

を含んで成る、DNA配列。

5. 前記第一ポリペプチドをコードする配列が下記の配列：

GAC ATT CTC ATG TCA CAG TCT CCA TCC TCC CTA CCT GCG TCA  
CTT GCG CAG AAG GGT ACT TTG AGC TGC AAG TCC AGT CAG AGC  
CTT TCA TAT AGT GGT AAT CAA AAG AAC TAC TTG GCG TCG TAC  
CAG CAG AAT CCA GGG CAG TCT CCG AAA CTG CTG ATT TAC TGG  
GCA TCC GGT AGC CAA TCT GCG GTC CCT GAT CCG TTC ACA GGC  
AGT GGA TCT GGG ACA CAT TTC ACT CTC TCC ATC AGC AGT CTG  
AAG ACT GAA GAC CTG GCA GGT TAT TAC TGT CAG CAG TAT TAT  
AGC TAT CCG CTC AGC TTC GGT GCT GGG ACC AAG CTG CTG CTG  
AAG

と実質的に同じであり、そして前記第二ポリペプチドをコードする配列が下記の  
配列：

GAG GTT CAG TTC CAG CAG TCT GAC GCT CAG TTC CTG AAA CCT  
GGG GCT TCA CTG AAG ATT TCC TGC AAG GCT TCT GGC TAC ACC  
TTC ACT CAG CAT GCA ATT CAC TCG CTG AAA CAG AAC CTT GAA  
CAG GCG CTG GAA TCG ATT GCA TAT TTT TCT CCG GGA AAT CAT  
GAT TTT AAA TAC AAT CAG AGC TTC AAG CCG AAC GCG ACA CTG  
ACT GCA GAC AAA TCC TCC AGC ACT CCG TAC CTG CAG CTC AAC  
AGC CTG ACA TCT GAG GAT TCT GCA CTG TAT TTC TGT ACA AGA  
TCC CTG AAT ATG GCG TAC TGG GGT CAA GGG ACC TCA CTC ACC  
GTC TCC TCA

と実質的に同じである、請求項1記載の DNA配列。